

UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD (XI)  
U.F.R SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Document présenté pour obtenir:

L'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

Biologie et physiologie moléculaire du développement du fruit de caféier

par

Pierre MARRACCINI  
Chercheur au Cirad - UMR DAP 1098

Soutenance le 10 Octobre 2008 devant la commission d'examen :

D<sup>r</sup> Didier COURTOIS, Centre R&D Nestlé-Tours  
D<sup>r</sup> Alexandre DE KOCHKO, IRD  
P<sup>r</sup> Michel DRON, Université Paris 11  
P<sup>r</sup> Pascal GANTET, Université Montpellier II  
P<sup>r</sup> Guillaume TCHERKEZ, IBP, CNRS

Examineur  
Rapporteur  
Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur

# Sommaire

Remerciements.....	3
A - Curriculum vitae.....	5
B - Liste de titres et travaux.....	9
C - Parcours scientifique.....	13
Avant-propos.....	13
C-1. D'où proviennent nos grains de café? .....	13
- C-1.1. Quelles définitions de la qualité? .....	14
- C-1.2. Quels sont les facteurs qui affectent la qualité?.....	15
- C-1.3. Sur les pistes de la qualité du café.....	16
- C-1.4. Les réactions de Maillard.....	17
- C-1.5. Le point sur la génomique du caféier.....	18
C-2. Le développement du grain de caféier.....	19
C-3. Les protéines de réserve: précurseurs d'arômes.....	20
- C-3.1. Les protéines de réserves du caféier sont des légumine.....	21
- C-3.2. Les protéines de réserves et le développement du grain.....	22
- C-3.3. Le promoteur du gène <i>CSP1</i> : un premier outil moléculaire?.....	23
C-4. Caractérisation du gène <i>rbcS</i> de <i>Coffea arabica</i> L.....	24
C-5. Etude du métabolisme des polysaccharides.....	26
- C-5.1. L' $\alpha$ -galactosidase du grain de caféier.....	27
- C-5.2. Les endo- $\beta$ -mannanases du grain de caféier.....	29
C-6. Etude du métabolisme du saccharose: un autre précurseur d'arôme.....	33
- C-6.1. Evolution des sucres au cours de la maturation du grain de caféier....	34
- C-6.2. La saccharose synthétase.....	35
D. Conclusions et perspectives.....	37
Quels bilans de ses travaux ?.....	38
E. Projet de recherche : Etude des mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans la tolérance à la sécheresse chez le caféier.....	39
- E.1. Situation du sujet.....	39
- E.2. Projet de recherche.....	39
-E.2.1. Recherche de gènes candidats (GC).....	40
- E.2.2. Analyse du polymorphisme nucléotidique des GC.....	41
- E.2.3. Validation des GC.....	41
- E.2.4. Construction d'une carte génétique de <i>Coffea</i> pour le caractère de tolérance à la sécheresse.....	42
- E.2.5. Effets du stress hydrique sur la qualité organoleptique de la boisson.....	42
- E.3. Conclusions et perspectives.....	42
Références bibliographiques.....	44
Tableau récapitulatif des publications.....	49

## Remerciements

Il y a 25 ans, je m'asseyais sur les bancs de la fac de Tours, mon Bac juste en poche et sans avoir une idée claire de ce que je voulais faire. Comme beaucoup, j'ai été poussé un peu malgré moi, ne sachant pas si j'allais trouver la motivation suffisante pour suivre un cursus complet. Il faut dire que les services administratifs ne m'avaient pas mis en confiance à mon arrivée. Doutant en effet du niveau de mon baccalauréat agricole série D' (prononcer «déprime» !), je me suis rapidement retrouvé dans une salle mal éclairée pour passer un examen d'évaluation des connaissances, préalable obligatoire à une inscription en DEUG B. J'avais tout d'abord trouvé ça bizarre, car je pensais que les diplômes étaient nationaux et que mon Bac, même «mention passable», aurait fait l'affaire. Puis dans un deuxième temps, m'est venu un sentiment d'injustice : de quel droit pouvait-on me clouer là pour me mettre à nouveau à l'épreuve ? A cette époque, je me rappelle en avoir voulu aux services administratifs de l'université. Mais maintenant, avec plus de recul, je voudrai les remercier ici en premier lieu car ils sont les premiers à m'avoir motivé, me forçant à montrer que je pouvais y arriver....

Plus sérieusement, mes remerciements vont à plusieurs professeurs de l'université de Tours qui ont su me faire aimer leurs matières. Je voudrais citer ici notamment messieurs Guyot, Doireau et Périquet. Leurs enseignements étaient de qualité et passionnants et je suis convaincu, à posteriori, qu'ils comptent pour beaucoup dans l'amour de mon métier. L'absence de deuxième cycle en sciences du végétal à Tours, m'a poussé à l'exil à Orsay-Paris XI. Mon DEUG B en poche, je pensais qu'il n'y aurait pas de tracasseries pour m'inscrire en Licence de physiologie végétale. Que nenni ! Sous prétexte de venir de province (où forcément les enseignements sont de plus mauvaise qualité ?), je me retrouve avec quelques congénères pour passer un examen de test des connaissances. Quelques mois plus tard, il faudra attendre les résultats finaux des examens de la licence de physiologie puis de la Maîtrise de génétique pour retrouver aux premières places une bonne partie des tourangeaux. Mes remerciements s'adressent aussi à plusieurs professeurs de Paris XI qui ont su entretenir et attiser la flamme allumée à Tours, tout particulièrement à madame Marguerite Picard et à messieurs Jean Guern, Jean-Luc Rossignol, André Adoutte et Jean Pernes.

Et puis, il y a des rencontres qui même fugaces laissent des traces. Celle avec Monique Bolotin-Fukuhara, au cours de ma maîtrise, a été la première. Sur les conseils de quelques amis déjà en stage dans son laboratoire, je suis allé voir Monique et elle m'a confié un petit sujet, partie de la thèse de Bertrand Daignan-Fornier: il s'agissait d'étudier l'expression d'un gène de levure (dont j'avoue avoir oublié le nom) à l'aide d'une fusion avec la  $\beta$ -galactosidase dans différentes conditions physiologiques. Tant bien que mal, pendant 3 mois et en parallèle aux cours, je venais «manipuler», préparer quelques solutions, extraire quelques plasmides et les digérer. J'essayais de comprendre ce que je faisais, de poser des questions (pas trop stupides) et de m'accrocher à l'enthousiasme ambiant et aux grandes discussions entre Monique et Bertrand. J'avoue que j'avais un peu de mal à suivre mais j'étais heureux. Je ne sais même pas si Monique et Bertrand se souviennent de moi. Me concernant, leurs souvenirs restent indélébiles et je les remercie infiniment de m'avoir donné la chance de mettre pour la première fois les pieds dans un labo. Après, mon passage au bâtiment 400-402, c'était confirmé : ce sera recherche et enseignement...! Mais avant, il y a eu la traversée du désert pendant l'année de service national. Je ne remercie pas le capitaine orienteur qui m'a attribué la charge de magasinier comptable au mess des officiers, simplement sous le prétexte qu'avec une maîtrise de génétique je devais forcément savoir gérer les flux, pas de gènes, mais de boîtes de haricots et des paquets de café (tiens, déjà...).

Ma lettre de recommandation de Monique en poche, je postule au DEA de Biologie moléculaire et cellulaire végétale codirigé par Francis Quétier et Pierre Gadal au retour de l'armée. Les neurones fortement chloroformés, j'étais dans mes petits souliers. Francis et Pierre m'ont donné une chance : qu'ils en soient ici profondément remerciés. J'avoue avoir beaucoup ramé au début mais je me suis accroché. Indéniablement, la formule du DEA était du «sur-mesure» avec les nombreux stages de grande qualité à l'ISV et à l'INRA de Versailles qui permettaient enfin de toucher du doigt les grandes questions scientifiques : la régulation de l'expression de gènes, la transgénèse des végétaux, les ribozymes, le trans-splicing chloroplastique....

Le choix du stage de DEA a été l'occasion d'une autre rencontre importante, celle avec Franck Chauvat. J'entends encore les commentaires étonnés des copains de promo : «Mais pourquoi as-tu choisi les cyanobactéries?». Tout simplement parce que dès les premières minutes, Franck m'a fait aimer le sujet de stage, qui deviendra ensuite celui de ma thèse. Etudier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes dans un organisme photosynthétique mais procaryote: ça restait dans le monde du vert (tirant sur le bleu) mais avec beaucoup d'atouts ! Un organisme, *Synechocystis* PCC 6803, à l'origine des chloroplastes avec un système de transformation génétique efficace : voilà un modèle de choix, par exemple pour l'étude de la photorégulation des gènes au niveau transcriptionnel. Le clonage du promoteur du gène *psbB* codant pour la protéine CP-47 du photosystème II constituera mon sujet de DEA et l'isolement de promoteurs photorégulés celui de ma thèse. Avec Franck, j'ai tout appris: la rigueur dans le travail, à m'interroger sur chacun de mes gestes à la paillasse, à écrire et à présenter, bref à devenir chercheur. Ma première place au DEA et les félicitations du jury de thèse

sont les fruits de longues discussions, d'un investissement en temps sans compter : le propre des perfectionnistes ! C'est vrai que ça n'a pas toujours été facile mais à posteriori, j'en ai tiré que des bénéfices. Franck, reçoit ici mes plus profonds remerciements qui vont bien sur aussi à Corinne.

Courant 1993, c'est aussi l'époque des vaches maigres : plus de bourse MRT et déjà un petit bout à s'occuper. Merci à je ne sais plus qui au rectorat de Versailles qui, après un harcèlement intense, fini par me confier une vacation de 5 mois (cours de microbiologie, TP de bactériologie) au BTS de Biotechnologie de Gif-sur-Yvette puis un remplacement de professeur d'hématologie et de bactériologie au Lycée Marie Curie de Versailles. Pas facile en même temps que la rédaction de la thèse, de gérer ces activités d'enseignements éloignées de mon cursus... mais extrêmement formateur. Après plusieurs incertitudes sur le choix du post-doc (encore toutes mes excuses à Franck sur mes indécisions permanentes à cette époque), je me retourne vers Pierre Gadat. «Et alors, où pourrais-je atterrir?». «Contacte Paco Canovas et postule pour des bourses» m'a-t-il répondu et me voilà à Malaga (déjà le goût des pays du sud !). Merci beaucoup à Paco qui m'accueillera 4 mois dans son laboratoire avec beaucoup d'enthousiasme. Je serai bien resté un peu plus pour travailler sur les *Pinus*, mais en l'absence de bourses et en prévision de l'arrivée du deuxième, il a fallu rapatrier. Me revoilà en face de Pierre Gadat. «Et alors, où pourrais-je atterrir?». «Je viens de recevoir cette annonce de Nestlé à Tours: va voir !». Coup de chance ou opportunisme !. En tout cas, merci beaucoup à Pierre qui à chaque fois, a su prendre le temps de m'écouter.

Un entretien avec Vincent Pétiard et Didier Courtois, une conférence devant les chercheurs du Centre R&D Nestlé-Tours et je suis recruté pour 2 ans en post-doc. Je découvre un autre univers, celui du caféier et du café, et aussi la joie de travailler dans d'excellentes conditions au sein d'une équipe qui se crée. Je ne remercierai jamais assez Vincent pour ses encouragements et la confiance qu'il m'a accordé. Merci beaucoup aussi à Alain Deshayes pour son soutien et ses conseils éclairés sur les projets. Difficile de ne pas mentionner aussi tous les collègues, à Tours ou à Lausanne, avec lesquels j'ai interagi et partagé mon quotidien : John Rogers, Françoise Lausanne, Victoria Caillet, Sylviane Tessereau et les stagiaires que j'ai encadrés. Presque tous sont repartis avec une publication signe que nous avons vraiment fait du bon travail. Enfin, merci à Hervé Vaucheret qui m'a permis de réaliser les tests GUS des tabacs transformés au sein de son laboratoire.

Après 8 ans au Centre R&D Nestlé-Tours, quelle mouche m'a piqué? L'envie de changer, de mettre à profit mes connaissances...les raisons sont multiples. Je postule au Cirad sur un poste fléché au Brésil et toujours sur le caféier. C'est le grand saut (sot ?): est ce bien raisonnable ? Je me suis posé plusieurs fois cette question mais plus maintenant. En tout cas, merci beaucoup à Denis Despréaux, Dominique Berry et Dominique Nicolas pour m'avoir accordé leur confiance. Je n'étais pas sûr de pouvoir relever le défi qui consistait développer nos collaborations scientifiques avec le Brésil, d'autant que mes futurs collègues voyaient d'un œil circonspect ce « transfuge » du privé. Bien entendu, un très grand merci à tous mes collègues caféier (Thierry Leroy, David Pot, Christophe Montagnon, Bernard Guyot...) sans lesquels tout ceci ne serait pas arrivé.

Enfin, je voudrais remercier tous mes collègues brésiliens avec lesquels j'espère qu'il sera encore possible de travailler pendant longtemps, en tout premier lieu Luiz Gongazo Esteves Vieira grâce auquel tout a commencé, Luiz Filipe Protasio Pereira, Paulo Mazzafera et plus récemment Alan Andrade Carvalho et Gustavo Costa Rodriguez, avec lesquels l'histoire a continué...

Merci à ma Marie, à Jérémy, Thomas et Manon qui endurent mon stress quand j'écris le soir ou lorsque je mobilise l'ordinateur...trop longtemps à leur goût !

Merci à ma mère, à mes beaux parents de supporter l'absence de leurs petits enfants.

Merci à mon père.

Enfin, merci beaucoup aux membres du jury d'avoir bien voulu prendre le temps de lire ces quelques pages et d'écouter mon histoire.

## A – Curriculum vitae

### A.1. Etat civil

Pierre MARRACCINI

Né le 28 juillet 1964, à Suresnes (92)

Nationalité Française

Marié, trois enfants

Obligations militaires (10-87 / 09-88)

Adresse personnelle: SHIS QI 21 Conjunto 13 Casa 12 - Lago Sul  
71655-330 Brasilia DF - Brésil  
E-mail: [pierremarraccini@yahoo.fr](mailto:pierremarraccini@yahoo.fr)  
Tel: +55 61 3222 0333

Adresse professionnelle: EMBRAPA -Cenargen  
Centre des Ressources Génétiques et Biotechnologie  
Parque Estação Biologia  
70770-900 Brasilia DF - Brésil  
E-mail: [pierrem@cenargen.embrapa.br](mailto:pierrem@cenargen.embrapa.br)  
Tel: +55 61 3448 4795

Adresse administrative: Cirad UMR DAP  
Avenue Agropolis - TA 80 / 03  
34398 Montpellier cedex 5 - France  
E-mail: [marraccini@cirad.fr](mailto:marraccini@cirad.fr)

Sites web:

<http://umr-dap.cirad.fr/equipes/burst>

[http://www.cirad.org.br/bresil\\_fr/recherche\\_et\\_developpement/genomique\\_et\\_protection\\_des\\_cultures/physiologie\\_moleculaire\\_du\\_cafeier](http://www.cirad.org.br/bresil_fr/recherche_et_developpement/genomique_et_protection_des_cultures/physiologie_moleculaire_du_cafeier)

### A.2. Diplômes et titres universitaires

**1993: Doctorat en sciences** - Université Orsay Paris XI

**Spécialité** « Biologie moléculaire et cellulaire végétale »

**Titre :** Isolement de promoteurs photorégulés chez la cyanobactérie *Synechocystis* 6803 et construction d'un vecteur de test des promoteurs à large spectre d'hôte.

Mention très honorable avec félicitations du jury

**1989: DEA Biologie moléculaire et cellulaire végétale** - Université Orsay Paris XI

**Titre :** Clonage du promoteur putatif du gène *psbB* de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803

Mention très bien

**1987: Maîtrise de génétique** - Université Orsay Paris XI

**1986: Licence de biologie cellulaire et physiologie** - Université Orsay Paris XI

**1985: DEUG B «Sciences de la nature et de la vie»** - Université Tours

**1982: Baccalauréat série D' «Sciences agronomiques et technologiques»** - Nantes

### A.3. Activités professionnelles

**2006:** Chercheur au Cirad - département BIOS - UMR 1098 DAP (Développement et Amélioration des Plantes) – équipe «BURST» (Biologie cellulaire de Réponse aux Stress chez les espèces Tropicales), affecté au Centre des Ressources Génétiques et de Biotechnologie (Cenargen) de l'Embrapa (Brasilia DF, Brésil).

Projet de coopération technique entre l'Embrapa, l'Incapar et le Cirad portant sur l'étude du déterminisme génétique de la tolérance à la sécheresse chez le caféier.

Durée: 3 ans renouvelable (2007-2009)

**2001:** Chercheur au Cirad - département CP (cultures pérennes) - UMR PIA (Polymorphisme d'Intérêt Agronomique) – équipe «Génétique de la qualité du café», affecté au IAPAR (Institut agronomique du Paraná, Londrina PR, Brésil).

Projet de coopération scientifique portant sur l'étude du déterminisme génétique de la qualité chez le caféier.

Durée: 4 ans (2002-2005)

**1996:** Chercheur au Centre R&D Nestlé-Tours (France)

Projet: Clonage et étude de l'expression de gènes de caféier *Coffea arabica* en relation avec la qualité.

Durée: 6 ans

**1994:** Stage postdoctoral au Centre R&D Nestlé-Tours (France)

Projet: Clonage et étude de l'expression de gènes de caféier *Coffea arabica* codant pour les protéines de réserves du grain.

Durée: 2 ans

**1993:** Stage postdoctoral Université de Málaga (Espagne)

Projet: Etude du promoteur de la glutamine synthétase de *Pinus sylvestris*.

Durée: 4 mois (financement par le Gouvernement d'Andalousie) sous la direction du Pr. Francisco M. Cánovas

**1989-1992:** Thèse réalisée au laboratoire de biochimie et de génétique moléculaire du Centre d'Etude Nucléaire de Saclay sous la direction du Dr Franck Chauvat.

Projet: Isolement de promoteurs photorégulés chez la cyanobactérie *Synechocystis* 6803 et construction d'un vecteur de test des promoteurs à large spectre d'hôte.

Durée: 3 ans (bourse du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur)

## A.4. Stages

**1988:** Stage de DEA réalisé au laboratoire de biochimie et de génétique moléculaire du Centre d'Etude Nucléaire de Saclay sous la direction du Dr Franck Chauvat.

Projet: Clonage du promoteur putatif du gène *psbB* de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803

Durée: 1 an

**1987:** Stage volontaire réalisé dans le laboratoire de génétique moléculaire des levures (UA 86) de l'Université Orsay Paris XI, sous la direction du Dr Monique Bolotin-Fukuhara.

Durée: 3 mois

## A.5. Formation continue

**2007:** Technique de qPCR, Applied Biosystems, São Paulo-Brésil

**2000:** "Patents and Contracts": séminaire de formation interne Nestlé, Centre R&D Nestlé-Beauvais, France.

**1999:** Conduite des autoclaves, APAVE, Centre Nestlé R&D Beauvais Tours-France.

**1999:** Bioinformatique: "Databases: handling protein and nucleic sequences", Infobiogen, Villejuif, France.

**1999:** Management of labelled elements in scientific laboratories, INSTN, Saclay-France.

**1998:** Formation PowerPoint 97 ADHARA Tours-France.

**1998:** Formation Excel 97 ADHARA Tours-France.

**1996:** Séminaire de formation aux nouveaux collaborateurs R&D, Nestlé, Vevey-Suisse.

## A.6. Activités pédagogiques

### A.6.1. Enseignement

**1998-2001:** cours-conférence Master II physiologie végétale, Université Tours-France

**1993:** Professeur de biologie au Lycée Marie Curie, Versailles-France

Classe de 1<sup>ère</sup> SMS (Sciences Médico-sociales)

Classe de terminale STL (Sciences et Technologies de Laboratoire)

Préparation cours de biologie générale et bactériologie (6h hebdomadaire)

TP de bactériologie et d'hématologie (4h hebdomadaire)

Durée: 6 mois (vacataire)

**1992:** Professeur de microbiologie Lycée Vallée de Chevreuse, Gif s/Yvette-France

1<sup>ère</sup> année BTS de biotechnologie

Préparation cours de mycologie et bactériologie (6h hebdomadaire)

TP de bactériologie (4h hebdomadaire)

Durée: 6 mois (vacataire)

## A.6.2. Formation à la recherche

### Thèses:

- Clara Geromel (Unicamp): août 2006 (co-encadrement, jury de thèse)
- Clovis O. Silva (Unicamp): septembre 2006 (comité directeur de thèse)

### Stages de Master, DESS, DIU et DIRS:

- Thomas Marques, Master 2 : Biologie Fonctionnelle des Plantes, Université Montpellier II  
Sujet: Analyse de l'expression de gènes candidats pour la tolérance à la sécheresse chez *Coffea sp.*. Durée: 6 mois (2008)
- Sonia Elbelt, Master 2 Professionnel Génomique et Technologies Avancées des Plantes, Université Montpellier II  
Sujet: Analyse de l'expression de gènes candidats pour la tolérance à la sécheresse chez *Coffea canephora* var. Conillon. Durée: 7 mois (2007)
- Alexandre Tromas (stage volontaire)  
Sujet: Analyse d'expression de gènes candidats pour la tolérance à la sécheresse chez le caféier. Durée: 2 mois (2006)
- Anthony Meunier, DESS Microbiologie Appliquée et Génie Biologique, Université Paris XI.  
Sujet: Clonage d'un gène codant une protéine périsperme-spécifique du grain de *Coffea arabica* var. Caturra. Durée: 6 mois (2001)
- Carine Courjault, DIU Biotechnologies Végétales, Université Paris XI.  
Sujet: Clonage d'un gène *rbcS* de *Coffea arabica* var. Caturra. Durée: 6 mois (2000)
- Charlotte Gaborit, DIU Biotechnologies Végétales, ENSA Rennes.  
Sujet: Clonage de l'ADNc de l'endo- $\beta$ -mannanase dans un vecteur de transformation génétique / Clonage du gène GOS2 de caféier et de son promoteur. Durée: 7 mois (1998-1999)
- Cyril Allard, IUP Bioingénierie option Biotechnologies Appliquées au Végétal, Université Toulouse III.  
Sujet: Clonage de l'ADNc partiel d'une endo- $\beta$ -mannanase de *Coffea arabica* var. Caturra. Durée: 8 mois (1998)
- Eric Imbert, Master I, Université Tours-France  
Stage d'initiation aux techniques de biologie moléculaire (séquençage) 1 mois (1996)

### Encadrement de techniciens et ingénieurs

- Lucia P. Ferreira (IAPAR): 2002-2005
- Victoria Caillet (Centre R&D Nestlé-Tours): 1998-2001
- Françoise Lausanne (Centre R&D Nestlé-Tours): 1997-2001
- Brigitte Lepage (Centre R&D Nestlé-Tours): 2000-2001
- Sylviane Tessereau-Lechat (Centre R&D Nestlé-Tours): 2000-2001

## A.6.3. Participation à des jurys et comités d'évaluation

- 2008: Jury de thèse de Master Hellen Marília Couto de Abreu, Université Campinas (Unicamp), SP-Brésil  
Titre: "Proteases e qualidade da bebida de cafés cultivados em regiões climatologicamente diferentes"
- 2006: Jury de thèse de Doctorat Clara Geromel, Université Campinas (Unicamp), SP-Brésil  
Titre: "Metabolismo da sacarose em frutos de café"
- 2006: Comité de thèse de Doctorat Clovis O. Silva, Université Campinas (Unicamp), SP-Brésil  
Titre: "Purificação e caracterização de uma alfa-galactosidase de endosperma de *Coffea arabica* var. Mundo Novo, e sua importância no processo de biossíntese do manano de reserva"
- 1999: Jury DIRS Martial Pré, Université Tours-France  
Titre: Clonage par la méthode de simple hydride chez la levure d'ADNc codant des protéines *trans*-régulatrices interagissant spécifiquement avec la G-box du promoteur du gène codant la strictosidine synthase chez *Catharantus roseus*.
- 1993: Jury de baccalauréat (série A), épreuves orales  
Jury de BTS Biotechnologie, épreuves pratiques

## A.7. Collaborations scientifiques

- Dr Gustavo Costa Rodrigues, Embrapa Cerrado (CPAC), Planaltina-DF, Brésil  
Projet: Plasticité Phénotypique des plantations pérennes sous contrainte hydrique au champ.  
Support financier: ATP Cirad/ Ambassade de France au Brésil-DCSUR-BRE-4C5-008.
- Dr Alan Carvalho Andrade, Embrapa Cenargen, Brasília-DF, Brésil et Dr Aymbiré Da Fonseca, Incaper, Vitória-ES, Brésil  
Projet: Etude du déterminisme de la tolérance à la sécheresse chez le caféier.  
Support financier: MAE/ Ambassade de France au Brésil-DCSUR-BRE-4C5-008, Consortium brésilien de R&D café (2007-2009), FINEP, EMBRAPA "Macroprogramma".
- Dr Maria.T. Benassi, UEL, Londrina-PR, Brésil  
Projet IAPAR/UEL/Cirad: Etude du métabolisme des diterpènes (cafestol et kahweol) chez le caféier.  
Support financier: MAE/ Ambassade de France au Brésil-DCSUR-BRE-4C5-008, Consortium brésilien de R&D café (2006-2008), CNPq.
- Dr Luis G.E. Vieira, IAPAR, Londrina-PR, Brésil  
Projet IAPAR/Cirad: Etude du métabolisme des sucres au cours du développement de fruit de caféier.  
Support financier: MAE/ Ambassade de France au Brésil-DCSUR-BRE-4C5-008, Consortium brésilien de R&D café (2002-2005).
- Pr Paulo Mazzafera, Unicamp, Campinas-SP, Brésil  
Projet: Etude du métabolisme des sucres au cours du développement de fruit de caféier.  
Support financier: MAE/ Ambassade de France au Brésil-DCSUR-BRE-4C5-008, Consortium brésilien de R&D café (2002-2005), FAPESP, CNPq.
- Pr Marcos Buckeridge, USP / Institut de Botanique, São Paulo-SP, Brésil  
Projet: Caractérisation d'une nouvelle forme d' $\alpha$ -D-galactosidase végétale chez le caféier *Coffea arabica*.  
Support financier: FAPESP, CNPq.

## A.8. Expertises scientifiques (évaluation d'articles pour des revues de rang A)

*Revues et périodiques :*

Brazilian Journal of Plant Physiology (2 articles)

Plant Breeding (3 articles)

Plant Molecular Biology (1 article)

Plant Physiology and Biochemistry (3 articles)

Phytochemistry (1 article)

*Livres:* Genomics of Tropical Crop Plants (1 article)

## A.9. Vie collective

Membre de la Société Brésilienne de Physiologie Végétale depuis 2004

Participation au Consortium International en Biologie Avancée (CIBA) entre l'EMBRAPA et Agropolis International.

## A.10. Responsabilités administratives

**1999-2001:** NEMS ("Nestlé Environmental Management System"): Responsable sécurité «plantes et micro-organismes GMO».

## A.11. Compétences linguistiques

**1. Français** (Langue maternelle)

**2. Anglais** (courant)

**3. Portugais** (courant)

**4. Espagnol** (compris et lu)



## B – Liste de titres et travaux

Sites web : <http://publications.cirad.fr/auteur.php?mat=5079> et <http://lattes.cnpq.br/3320047503985931>

### B.1. Publications d'articles scientifiques dans des revues à comité de lecture

(Les noms des étudiants et techniciens encadrés sont soulignés. La liste des facteurs d'impact est donnée en fin de mémoire)

- Geromel C., Ferreira L.P., Davrieux F., Guyot B., Ribeyre F., dos Santos Scholz M.B., Pereira L.F.P., Vaast P., Pot D., Leroy T., Androcioli Filho A., Vieira L.G.E., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2008). Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 569-579.
- Geromel C., Ferreira L.P., Bottcher A., Pot D., Pereira L.F.P., Leroy T., Vieira L.G.E., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2008). Sucrose metabolism during fruit development in *Coffea racemosa*. *Ann. Appl. Biol.* 152: 179-187.
- Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Guerreiro S.M.C., Vieira L.G.E., Leroy T., Pot D., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2006). Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *J. Exp. Bot.* 57: 3243-3258.
- Leroy T., **Marraccini P.**, Dufour M., Montagnon C., Lashermes P., Sabau X., Ferreira L.P., Jourdan I., Pot D., Andrade A.C., Glaszmann J.C., Vieira L.G.E., Piffanelli P. (2005). Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. *Theor. Applied Genet.* 111: 1032-1041.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Caillet V., Deshayes A., Granato D., Lausanne F., Lechat S., Pridmore D., Pétiard V. (2005). Biochemical and molecular characterization of  $\alpha$ -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 909-920.
- Gaborit C., Caillet V., Deshayes A., **Marraccini P.** (2003). Molecular cloning of a full-length cDNA and gene from *Coffea arabica* encoding a protein homologous to the Yeast translation initiation factor SUI1: expression analysis in plant organs. *Braz. J. Plant Physiol.* 15: 55-58.
- **Marraccini P.**, Courjault C., Caillet V., Lausanne F., Lepage B., Rogers W.J., Deshayes A. (2003). Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 17-25.
- Avila C., Canton F., Barestein P., Suárez M.F., **Marraccini P.**, Rey M., Humara J.M., Ordas R.J., Canovas F. (2002). Structural and functional characterization of 5' upstream region of glutamine synthetase gene from scots pine. *Ann. For. Sci.* 58: 669-673.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Allard C., André M.-L., Caillet V., Lacoste N., Lausanne F., Michaux S. (2001). Molecular and biochemical characterization of endo- $\beta$ -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213: 296-308.
- Avila C., Cantón F., Barnestein P., Suárez M.-F., **Marraccini P.**, Rey M., Humara J.M., Ordás R., Cánovas F.M. (2001). The promoter of a cytosolic glutamine synthetase gene from conifer *Pinus sylvestris* is active in cotyledons of germinating seeds and light-regulated in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 112: 388-396.
- **Marraccini P.**, Deshayes A., Pétiard P., Rogers J.W. (1999). Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 273-282.
- Rogers W.J., Bézard G., Deshayes A., Pétiard V., **Marraccini P.** (1999). Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 261-272.
- **Marraccini P.**, Cassier-Chauvat C., Bulteau S., Chavez S., Chauvat F. (1994). Light-regulated promoters from *Synechocystis* PCC6803 share a consensus motif involved in photoregulation. *Mol. Microbiol.* 12: 1005-1012.
- Mermet-Bouvier P., Cassier-Chauvat C., **Marraccini P.**, Chauvat F. (1993). Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Curr. Microbiol.* 27: 323-327.
- **Marraccini P.**, Bulteau S., Cassier-Chauvat C., Mermet-Bouvier P., Chauvat F. (1993). A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Plant Mol. Biol.* 23: 905-909.

### B.2. Publications de revues dans des périodiques à comité de lecture

- De Castro R.D., **Marraccini P.** (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 175-199.
- Leroy T., Ribeyre F., Bertrand B., Charmetant P., Dufour M., Montagnon C., **Marraccini P.**, Pot D. (2006). Genetics of coffee quality. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 229-242.

### B.3. Publication de brevets

- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Deshayes A. (2003). Coffee plant with reduced  $\alpha$ -D-galactosidase activity. Patent WO 03/032713.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J. (2002). Leaf specific gene promoter of coffee. Patent WO 02/092822.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Pridmore D., Gysler C. (2001). Coffee mannanase. Patent WO 01/75084.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J. (2000). *Coffea arabica* Mannanases. Patent WO 00/28046.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J. (1999). Coffee Storage proteins. Patent WO 99/02688.

### B.4. Communications orales et affiches présentées à des colloques

#### B.4.1. Communications orales

- **Marraccini P.**, Ramos H., Vieira L.G.E., Ferrão M.A.G., da Silva F.R., Taquita J.A., Bloch Jr. C., Andrade A.C. (2008). Study of drought tolerance mechanisms in coffee plants by an integrated analysis. 22<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Campinas-Brazil. B212.
- Silva C.O., Ferreira L., **Marraccini P.**, Vieira L.G.E., Labate M.T.V., Labate C.A., Tine M.A.S., Tonini P.P., Buckeridge M. (2008). A novel alpha-galactosidase from coffee is likely to control mannan fine structure in developing seeds. Plant Biology, Mérida, Mexico. S053.
- **Marraccini P.**, Ramos H., Vieira L.G.E., Ferrão M.A.G., da Silva F.R., Bloch Jr. C., Andrade A.C. (2008). Integrated analysis of drought stress responses in coffee plants. Plant and Animal Genome XVI Conference, San Diego-USA.
- **Marraccini P.**, Geromel C., Ferreira L.P., Pereira L.F.P., Leroy T., Pot D., Ribeyre F., Guyot B., Scholz M.B., Androcioli-Filho A., Vieira L.G.E., Mazzafera P. (2006). Soluble sugars, enzymatic activities and gene expression during development of coffee fruit submitted to shade condition. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France, CD-rom B208.
- Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E., Leroy T., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2005). Metabolismo de açúcares durante o desenvolvimento de frutos de café. IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Londrina (PR)-Brazil.
- Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E., Leroy T., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2004). Sugar Metabolism during Coffee Fruit Development. 20<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Bangalore-Inde, CD-rom B216.
- **Marraccini P.** (2003). Controle do tamanho nas sementes de plantas. IX Brazilian Congress of Plant Physiology, Atibaia (SP)-Brazil.
- **Marraccini P.**, Allard C., André M-L., Courjault C., Gaborit C., Lacoste N., Meunier A., Michaux. S., Petit V., Priyono P., Rogers W.J., Deshayes A. (2001). Update on coffee biochemical compounds, protein and gene expression during bean maturation and in other tissues. 19<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Trieste-Italie, CD-rom B214.

## B.4.2. Affiches

- **Marraccini P.**, Rodrigues G.C., Rocha O.C., Guerra A.F., Andrade A.C., Leroy T., Pot D., Jourdan C., Gion J.M. (2008). Analysis of phenotypic plasticity in response to water constraints in coffee plants growing in field conditions. 22<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Campinas-Brazil. PB619.
- Almeida J.D., Barros L.M.G., Santos D.B.M., Cotta M.G., Barbosa E.A., Cação S.B., Eira M.T.S., Alves G.S.C., Vinecky F., Pereira L.F.P., da Silva F.R., Andrade A.C., **Marraccini P.**, Carneiro M. (2008). Prospection of tissue specific promoters in coffee. 22<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Campinas-Brazil. PB620.
- Pot D., Ferreira L.P., Dias R.C.E., Durand N., Guyot B., Ramos J., Perthuis B., Sandrin P., Benassi M.T., **Marraccini P.**, Pereira L.F.P., Leroy T., Vieira L.G.E. (2008). Genetic and molecular determinism of diterpene metabolism in *Coffea spp.* 22<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Campinas-Brazil. PB621.
- Vinecky F., Freire L.P., Vieira N.G., Alvarenga M.O., Marques T., **Marraccini P.**, Andrade A.C. (2008). Molecular characterization of candidate genes involved in drought resistance in coffee plants. 22<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Campinas-Brazil. PB640.
- **Marraccini P.**, Ramos H., Vieira L.G.E., Ferrão M.A.G., da Silva F.R., Bloch Jr C., Andrade A.C. (2008). Study of drought-tolerance mechanisms in coffee plants by an integrated analysis. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil. R8811.
- Ramos H.J.O., Andrade C.A., Seixas D.F., Rizzo L.E., Melo J.A.T., Magalhaes D.M., Huergo L., Galvão C.W., Pereira L.F.P., **Marraccini P.**, Cruz L.M., Souza E.M., Bloch Jr C., Pedrosa F.O., Vieira L.G.E. (2008). Differential protein expression analysis of *Coffea canephora* plants under drought stress. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil. R9410.
- Barros L.M.G., Cotta M.G., Barbosa E.A., Santos D.B.M., Abreu M.S., **Marraccini P.**, da Silva F.R., Rodrigues G.C., Eira M.T.S., de Almeida J.D., Andrade A.C., Carneiro M. (2008). Studies of a new lipid transfer protein (LTP) expressed during coffee fruit development. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil. R8961.
- **Marraccini P.**, Da Silva V.A., Elbelt S., Guimarães B.L.S., Loureiro M.E., DaMatta F.M., Ferrão M.A.G., Da Fonseca A.F.A., Da Silva F., Andrade A.C. (2007). Análise da expressão de genes candidatos para a tolerância a seca em folhas de clones de *Coffea canephora* var. Conillon, caracterizados fisiologicamente. V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (SP)- Brasil.
- Tiski I., Pereira L.F.P., Pot D., **Marraccini P.**, Vieira L.G.E. (2007). Análise *in silico* e *in vivo* da via de isoprenoides em café *Coffea arabica*. V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (SP)-Brasil.
- Vinecky F., Vieira N.G., Ferreira D.L.A., Freire L.P., **Marraccini P.**, da Silva F., Andrade A.C. (2007). Construção de macroarranjos de cDNA de café, para a identificação de genes de interesse agrônomo. V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (SP)-Brasil.
- Ferreira L.P., Plener L., **Marraccini P.**, Pereira L.F.P., Vieira L.G.E., Pot D. (2007). Identificação e caracterização molecular de genes envolvidos no metabolismo de diterpenos específicos do cafeeiro. V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (SP)-Brasil.
- Lannes S.D., Bouchet S., Ferreira L.P., Leroy T., Ivamoto S.T., **Marraccini P.**, Pereira L.F.P., Vieira L.G.E., Pot D. (2007). Polimorfismos nucleotídicos de genes envolvidos nas características químicas do grão de café, complementaridade das estratégias *in silico* e *in vivo*. V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (SP)-Brasil.

- Leroy T., Cubry P., Durand N., Dufour M., De Bellis F., Jourdan I., Vieira L.G.E., Musoli P., Aluka P., **Marraccini P.**, Pot D. (2006). *Coffea* spp. and *C. canephora* diversity evaluated with microsatellites and single nucleotide polymorphism lessons from comparative analysis. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France.
- Andrade A.C., Silva V.A., Vinecky F., Barbosa E.A., Da Silva F.R., Loureiro M.E., DaMatta F.R., **Marraccini P.**, Ferrão M.A.G., Da Fonseca A.A., Ferrão R.G., Melo J.A.T., Silva L.P., Bloch Jr. C. (2006). Identification and functional characterization of genes involved in drought stress responses in coffee plants. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France.
- **Marraccini P.**, Ferrão M.A.G., Da Fonseca A.F.A., Ferrão R.G., Pot D., Leroy T., Bloch Jr C., Andrade A.C. (2006). Study of biological mechanisms involved in drought tolerance in coffee plants. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France.
- Bouchet S., **Marraccini P.**, Jourdan I., Leroy T., Vieira L.G.E., Ferreira L.P., Musoli P., Pot D. (2005). Nucleotide diversity and molecular evolution of five genes involved in the sucrose biosynthesis pathway of *Coffea canephora*. Proceedings of the 4<sup>th</sup> Plant Genomics European meeting, Amsterdam-Hollande.
- Geromel C., Mazzafera P., **Marraccini P.R.**, Ferreira L.P., Vieira, L.G.E., Pereira, L.F.P. (2005). Dosagens das enzimas sintase da sacarose e invertase ácida e teores de açúcares solúveis e sacarose no fruto de café em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento. X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal, Recife (PE)-Brésil.
- Geromel C., Mazzafera P., **Marraccini P.**, Ferreira L.P., Vieira L.G.E., Pereira L.F.P. (2005). Açúcares solúveis, sacarose sintase e sacarose fosfato sintase durante o desenvolvimento do fruto de café, sob diferentes condições de luz a carga. IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Londrina (PR)-Brésil.
- **Marraccini P.**, Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E., Leroy T., Mazzafera P. (2004). Biochemical and molecular characterization of enzymes controlling sugar metabolism during coffee bean development. V Encontro Latino-Americano E Caribenho de Biotecnologia Vegetal, Boca Chica, République Dominicaine.
- Cavalari A.A., Geromel C., **Marraccini P.**, Mazzafera P. (2003). Partição do carbono durante a formação do endosperma de café. IX Brazilian Congress of Plant Physiology, Atibaia (SP)-Brésil.
- Geromel C., Cavalari A.A., **Marraccini P.**, Mazzafera P. (2003). Invertase ácida e sacarose sintase em folhas de café. IX Brazilian Congress of Plant Physiology, Atibaia (SP)-Brésil.
- **Marraccini P.**, Ferreira L.P., Geromel C., Cavalari A.A., Mazzafera P., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. (2003) Caracterização molecular e bioquímica de enzimas chave do metabolismo de açúcares em café. IX Brazilian Congress of Plant Physiology, Atibaia (SP)-Brésil.
- **Marraccini P.**, Pereira L.F.P., Ferreira L.P., Vieira L.G.E., Cavalari A.A., Geromel C., Mazzafera P. (2003). Biochemical and molecular characterization of enzyme controlling sugar metabolism during coffee bean development. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelone-Espagne.
- Leroy T., Dufour M., Montagnon C., Lashermes P., **Marraccini P.**, Sabau X., Glaszmann J.C., Piffanelli P. (2003) Characterisation of the first *Coffea canephora* coffee-tree BAC library. Barcelona-Spain: 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelone-Espagne.
- Ferreira L.P., Geromel C., Cavalari A.A., **Marraccini P.**, Mazzafera P., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. (2003). Caracterização molecular de enzimas chave do metabolismo de açúcares em café. III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Porto Seguro (BA)-Brésil.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Allard C., André M-L., Caillet V., Lacoste N., Lausanne F., Michaux S. (2000). Purification and cloning of cDNAs of mannanases from germinating coffee seeds. 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Québec-Canada.
- Rogers W.J., **Marraccini P.**, Allard C., André M-L., Caillet V., Lausanne F., Michaux S. (2000). Characterization of endo- $\beta$ -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. 8<sup>th</sup> International Symposium Plant Seeds, Dresde-Allemagne.
- Gantet P., Sibéril Y., Benhamron S., Giglioli-Guivarc'h N., Thiersault M., **Marraccini P.**, Boisson B., Courtois D., Doireau P. (1998). Cloning of cDNA encoding G-Box binding factors in *Catharantus roseus* that bind *in vitro* to the G-Box element of the strictosidine synthase gene promoter. 11<sup>th</sup> Colloque Biotechnocentre, Seillac-France.
- **Marraccini P.**, Deshayes A., Pétiard V., Rogers W.J. (1997). Functional analysis of a 5' flanking region of *Coffea arabica* L 11S storage protein gene in transgenic tobacco. 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Singapour.
- **Marraccini P.**, Deshayes A., Pétiard V., Rogers W.J. (1997). Isolation and characterization of a full-length cDNA encoding for an 11S-type seed storage protein of *Coffea arabica* L. endosperm.: 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Singapour.
- Rogers W.J., Bézard G., Deshayes A., Pétiard V., **Marraccini P.** (1997). An 11S-type storage protein from *Coffea arabica* L. endosperm: Biochemical characterization, promoter function and expression during grain maturation. 17<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Nairobi-Kenya, CD-rom 17\_019.
- **Marraccini P.**, Cassier-Chauvat C., Sentenac A., Chauvat F. (1991). Isolation and study of cyanobacterial DNA fragments involved in the control of gene expression in *Synechocystis* PCC6803. Third International Congress of Plant Molecular Biology, Tucson-USA.
- **Marraccini P.**, Chauvat F. (1990). Utilization of a promoter-probe plasmid to analyse endogenous promoters in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. First European Workshop on the Molecular Biology of the Cyanobacteria, Dourdan-France.

- **Marraccini P.**, Chavez S., Cassier-Chauvat C., Chauvat F. (1990). Utilization of promoter-probe plasmid to isolate genomic DNA fragments involved in light regulation of gene expression in *Synechocystis* PCC 6803. First European Workshop on the Molecular Biology of the Cyanobacteria, Dourdan-France.

### B.4.3. Résumés et articles dans des comptes-rendus de congrès

- Leroy T., Cubry P., Durand N., Dufour M., De Bellis F., Jourdan I., Vieira L.G.E., Musoli P., Aluka P., **Marraccini P.**, Pot D. (2006). *Coffea* spp. and *C. canephora* diversity evaluated with microsatellites and SNPs : lessons from comparative analysis. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France, CD-rom B219.
- Pot D., Bouchet S., **Marraccini P.**, De Bellis F., Cubry P., Jourdan I., Pereira L.F.P., Vieira L.G., Ferreira L.P., Musoli P., Legnate H., Leroy T. (2006). Nucleotide diversity of genes involved in sucrose metabolism. Towards the identification of candidate genes controlling sucrose variability in *Coffea* spp. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France, CD-rom B209.
- **Marraccini P.**, Geromel C., Ferreira L.P., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E., Leroy T., Pot D., Mazzafera P. (2006). Sucrose metabolism during fruit development of *Coffea racemosa*. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France, CD-rom PB255.
- Durand N., de Bellis F., Jourdan I., Manez J-C., Aluka P., Vieira L.G.E., Ogwanga J., Pot D., **Marraccini P.**, Leroy T., Guyot B. (2006). Biochemical and nucleotide variability in the diterpene metabolism for *Coffea canephora* genotypes from Uganda. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France, CD-rom PB289.
- Tiski I., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E., Takahashi E.K., Ferreira L.P., **Marraccini P.**, Pot D., Leroy T., Benassi M.T., Dias R.C.E. (2006). *In silico* and *in vitro* analysis of the isoprenoids pathway in coffee. 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier-France, CD-rom PB268.
- **Marraccini P.**, Allard C., André M-L., Courjault C., Gaborit C., Lacoste N., Meunier A., Michaux S., Petit V., Priyono P., Rogers W.J., Deshayes A (2001). Update on coffee biochemical compounds, protein and gene expression during bean maturation and in other tissues. 19<sup>th</sup> International scientific Colloquium on Coffee, Trieste-Italie, CD-rom B214.
- Rogers W.J., Bézard G., Deshayes A., Pétiard V., **Marraccini P.** (1997) An 11S-type storage protein from *Coffea arabica* L. endosperm: biochemical characterization, promoter function and expression during grain maturation. Proceedings of 17<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, pp 161-168.

### B.5. Séquences publiées dans les banques de données

- Melo G., Ferreira L.P., Vieira L.G.E., **Marraccini P.**, Mazzafera P.(2006). *Coffea arabica* mRNA for hydroxycinnamoyl transferase (hct1 gene) , accession number: AM116757.
- Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Guerreiro S.M.G., Vieira L.G.E., Leroy T., Pot D., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2005). *Coffea arabica* mRNA for sucrose synthase (sus1 gene), accession number: AM087674.
- Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Guerreiro S.M.G., Vieira L.G.E., Leroy T., Pot D., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2005). *Coffea arabica* mRNA for sucrose synthase (sus2 gene), accession number: AM087675.
- Geromel C., Ferreira L.P., Cavalari A.A., Pereira L.F.P., Guerreiro S.M.G., Vieira L.G.E., Leroy T., Pot D., Mazzafera P., **Marraccini P.** (2005). *Coffea arabica* sus2 gene for sucrose synthase, exons 1-15, accession number: AM087676.
- Leroy T., **Marraccini P.**, Dufour M., Montagnon C., Lashermes P., Sabau X., Ferreira L.P., Jourdan I., Pot D., Andrade A.C., Glaszmann J.C., Vieira L.G.E., Piffanelli P. (2005). *Coffea canephora* sus1 gene for sucrose synthase, exons 1-13, accession number: AJ880768.
- **Marraccini P.**, Pereira L.F.P., Ferreira L.P., Vieira L.G.E., Geromel C., Cavalari A.A., Mazzafera P., Leroy T. (2003). *Coffea arabica* partial mRNA for acid vacuolar invertase (*inv2* gene), accession number: AJ575258.
- **Marraccini P.**, Pereira L.F.P., Ferreira L.P., Vieira L.G.E., Geromel C., Cavalari A.A., Mazzafera P., Leroy T. (2003). *Coffea arabica* partial mRNA for cell-wall invertase (*inv1* gene), accession number: AJ575257.
- **Marraccini P.**, Pereira L.F.P., Ferreira L.P., Vieira L.G.E., Geromel C., Cavalari A.A., Mazzafera P., Leroy T. (2003). *Coffea arabica* partial mRNA for sucrose synthase (*sus1* gene), accession number: AJ575256.
- Gaborit C., Caillet V., Deshayes A., **Marraccini P.** (2003). *Coffea arabica* *sui1* gene, exons 1-5, accession number: AJ519840.
- Gaborit C., Caillet V., Deshayes A., **Marraccini P.** (2003). *Coffea arabica* mRNA for SUI1 protein, accession number: AJ519839.
- **Marraccini P.**, Courjault C., Caillet V., Lausanne F., Lepage B., Rogers W.J., Deshayes A. (2002). *Coffea arabica* mRNA for rubisco small subunit (*RBCS1* gene), accession number: AJ419826.
- **Marraccini P.**, Courjault C., Caillet V., Lausanne F., Lepage B., Rogers W.J., Deshayes A. (2002). *Coffea arabica* *RBCS1* gene for rubisco small subunit , accession number: AJ419827.
- **Marraccini P.**, Meunier A. (2002). *Coffea arabica* mRNA for DCL protein, accession number: AJ420083.
- **Marraccini P.** (2002). *Coffea arabica* partial mRNA for heat shock protein 70 (hsp70 gene), accession number: AJ420082.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Allard C., Andre M.L., Caillet V., Lacoste N., Lausanne F., Michaux S. (2001). *Coffea arabica* mRNA for (1-4)-beta-mannan endohydrolase (manB gene), accession number: AJ278996.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Allard C., Andre M.L., Caillet V., Lacoste N., Lausanne F., Michaux S. (2001). *Coffea arabica* mRNA for (1-4)-beta-mannan endohydrolase (manA gene), accession number: AJ293305.

- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Deshayes A., Pétiard V. (1999). *Coffea arabica csp1* gene, promoter region and partial coding region, accession number: Y16975.
- **Marraccini P.**, Rogers W.J., Deshayes A., Pétiard, V. (1999). *Coffea arabica* mRNA for 11S storage protein, accession number: Y16976.
- Avila C., Canton F.R., Barnestein P., **Marraccini P.**, Cánovas F.M. (1999). *Pinus sylvestris gln1a* gene, partial, accession number: AJ225121.

## B.6. Communications diverses

- Rapport internes Nestlé R&D (confidentiels): 6
- 2007: Cirad (rapport annuel 2006): p10-11 (<http://www.cirad.fr/fr/index.php>) "Des gènes impliqués dans la qualité du café"
- 2007: Cirad au Brésil (rapport d'activité 2005-2006)
- 2006: França Flash n°47, p3: ([www.cendotec.org.br/francaflash/ff47.pdf](http://www.cendotec.org.br/francaflash/ff47.pdf)): "Cooperação sobre a qualidade do café no Brasil"
- 2005: Cirad au Brésil (rapport d'activité 2003-2004)
- 2003: Cirad Info n°136
- 2002: França Flash n°32, p5: ([www.cendotec.org.br/francaflash/ff32.pdf](http://www.cendotec.org.br/francaflash/ff32.pdf)) : "Colaboração sobre o café"

## C – Parcours scientifique

### Avant propos

Comme vous pourrez vous en rendre compte à la lecture de ce mémoire, mon parcours scientifique est un peu atypique dans le sens où, par la force des choses mais aussi par choix personnels, j'ai été amené à travailler sur plusieurs projets, plusieurs modèles biologiques et dans plusieurs structures de recherches qui ont parfois des objectifs différents. De prime abord, ce parcours peut sembler chaotique et décousu : c'est peut-être vrai. En tout cas, je considère toutes ses expériences comme une énorme chance qui m'a été offerte. Pour essayer de dissiper ce trouble, j'ai décidé d'organiser ce mémoire en le focalisant sur «la biologie et la physiologie moléculaire du développement du fruit de caféier», et donc d'omettre volontairement de mentionner les travaux qui ont fait l'objet de ma thèse d'université («Isolement de promoteurs photorégulés chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803) et de mon stage postdoctoral («Etude du promoteur de la glutamine synthétase de *Pinus sylvestris*»). Parler du café, c'est vous présenter le grain et introduire la plante, connue de nom par chacun mais surement méconnue scientifiquement par beaucoup. En présentant cette plante et en la replaçant dans le contexte des dernières avancées scientifiques, j'espère avoir atteint mon objectif : celui de vous faire partager ma passion.

### C-1. D'où proviennent nos grains de café ?

Le caféier est un terme générique désignant plusieurs espèces de plantes du genre *Coffea* de la famille des Rubiacées (*Rubiaceae*) qui comprend plus d'une centaine d'espèces (Bridson et Verdcourt, 1988; Davis *et al.*, 2006). Parmi celles-ci, deux espèces sont principalement cultivées : *Coffea canephora* et *Coffea arabica*. Les espèces du genre *C. canephora* sont diploïdes ( $2n = 2x = 22$  chromosomes) et strictement allogames. En revanche, l'espèce *C. arabica*, préférentiellement autogame (Lashermes *et al.*, 1999), est la seule allotétraploïde ( $2n = 4x = 44$  chromosomes). Cette différence majeure de mode de fécondation entre ces deux espèces explique pourquoi on observe une plus grande diversité génétique au sein de *C. canephora* par rapport à *C. arabica* (Montagnon, 2000).

*C. canephora* est originaire des forêts du bassin du Congo dont l'altitude varie de 0 à 1200m (Fig. 1A). Cette espèce est adaptée aux climats chauds (températures annuelles moyennes entre 24°C et 26°C) avec peu d'amplitudes thermiques. Elle présente de nombreuses résistances naturelles aux maladies ou aux parasites justifiant son appellation de «Robusta». Cette caractéristique explique aussi son utilisation dans les programmes d'amélioration, en particulier au travers de l'emploi de l'«hybride de Timor» afin de créer de nouvelles variétés plus résistantes à la rouille (*Hemileia vastatrix*) (Van der Vossen, 2001). Par contre, *C. canephora* produit des grains généralement riches en caféine et en acides chlorogéniques qui confèrent une saveur amère à la tasse. C'est pour cette raison que le café «Robusta» est peu apprécié des consommateurs (Leroy *et al.*, 2006).

L'espèce *C. arabica* (Fig. 1B) est quant à elle originaire des hauts plateaux d'Ethiopie, dont l'altitude varie de 1600 à 2800m. Elle supporte donc des températures plus basses que *C. canephora* (moyenne annuelle comprise entre 18 et 21°C) et une pluviométrie moins abondante (1200 à 1800mm/an) (DaMatta et Ramalho, 2006). Contrairement à *C. canephora*, cette espèce est particulièrement sensible aux maladies. En revanche, elle

produit des grains avec peu de caféine et d'acides chlorogéniques (Ky *et al.*, 2001) et plus riches en sucres (saccharose) que *C. canephora* (Campa *et al.*, 2004), conduisant à un café aromatique à la tasse, légèrement acide et généralement très apprécié.

En marge de ces deux espèces cultivées, il existe également d'autres espèces comme *C. liberica*, cultivée en Inde, et *C. racemosa* dont la cueillette est pratiquée en Afrique de l'est. Cette dernière espèce est peu productive mais possède plusieurs caractéristiques agronomiques d'intérêt comme une bonne résistance à la mineuse des feuilles (*Perileucoptera coffeella*, Fig. 1C) et à la sécheresse (Fig. 1D). Pour ces raisons, *C. racemosa* est actuellement utilisé dans plusieurs programmes d'amélioration du caféier en particulier au Brésil (Guerreiro Filho, 1992).

Les caféiers issus de la germination de grain (*C. arabica*, Fig. 2A) ou du bouturage (*C. canephora*, Fig. 2B) subissent une période juvénile d'environ trois ans avant de réaliser leur première floraison. Celle-ci est généralement déclenchée par les fortes précipitations qui suivent une période prolongée de stress hydrique et s'observe sur les rameaux plagiotropes (Fig. 2C). Les fruits (Fig. 2D) sont des drupes de forme ovoïde, communément appelées «cerises», et contiennent généralement deux grains de café. Selon les espèces, la maturation varie de 7 à 9 mois pour *C. arabica* et de 10 à 12 mois pour *C. canephora*. (Berthaud et Charrier, 1988).

### C-1.1. Quelles définitions de la qualité?

La définition de la qualité change selon les acteurs qui interviennent le long de la chaîne de commercialisation du café, c'est à dire du producteur jusqu'à la tasse du consommateur.

Pour le producteur, la qualité est une combinaison entre le rendement, le prix d'achat de sa matière première et ses coûts de production. Pour l'exportateur ou l'importateur, la qualité est définie par la régularité des approvisionnements, les tonnages (stocks) disponibles, les prix des marchés internationaux et également par des critères portant sur la matière première elle-même comme par exemple la taille (calibre ou «peneira» en portugais) des grains et l'absence de défauts. Ces dernières caractéristiques font d'ailleurs l'objet de normes internationales très strictes éditées par l'ICO (2002). Au niveau du torréfacteur et de l'industrie de transformation, la qualité du café dépend bien entendu du prix mais aussi de son origine (traçabilité), de sa teneur en humidité, de sa qualité organoleptique (à la tasse) et par conséquent des composés biochimiques présents dans le grain. Enfin, pour le consommateur la qualité est un savant compromis entre le prix, le goût (la saveur), les arômes, les effets sur la santé (effets bénéfiques des antioxydants pour réduire les espèces d'oxygène actif ou «ROS»), la sécurité du produit (absence de résidus phytosanitaires) et son origine géographique. De plus en plus, les aspects sociaux-environnementaux (café organique, équitable, etc...) constituent également des critères de qualité essentiels pour le consommateur. Par ailleurs, chaque marché ou pays consommateur possède ses propres qualités organoleptiques : les allemands et les suédois aiment les cafés légers et plus acides que des Italiens. En Grèce, au Liban ou dans le nord de la France, les gens aiment le goût de "Rio" (goût spécifique dû au trichloroanisole). Au Brésil, le «cafezinho» est souvent sur-torréfié, ce qui lui donne un goût particulier de brûlé que l'on tente souvent de masquer par l'addition quasi-systématique de sucre.

## C-1.2. Quels sont les facteurs qui affectent la qualité?

Ces facteurs sont multiples et peuvent être classés en deux groupes : non génétiques et génétiques.

- Facteurs non génétiques

Le premier de ces facteurs concerne le mode de cueillette des cerises. Ainsi, il est connu que la méthode traditionnelle de récolte à la main (Fig. 3A) permet de sélectionner uniquement des fruits mûrs, ce qui produit un café de meilleure qualité que celui récolté par voie mécanique ou par «strip picking».

Le deuxième concerne les techniques de traitement des cerises après la récolte («postharvest») qui influencent très fortement la qualité organoleptique (Bytof *et al.*, 2000). Ainsi, la méthode «voie sèche», qui consiste à faire sécher les fruits soit naturellement (au soleil, Fig. 3B) ou dans des séchoirs rotatifs puis à ôter le péricarpe déshydraté (coque), produit des cafés généralement plus amères que ceux traités par voie humide (Barel et Jacquet, 1994). Le mode de préparation constitue d'ailleurs l'un des premiers critères de prix sur les marchés internationaux, les cours des Arabica lavés (type «colombien») étant systématiquement plus élevés que les Arabica traités par voie sèche («café em coco», café dans la coque typique du Brésil) (Prix indicatifs de l'OIC en cents d'euros la livre: «Colombian Milds»: 142,66 et «Brazilian Naturals»: 127,93; OIC Rapport sur le marché du café, 01/2007<sup>1</sup>). Même s'il existe des exceptions (Perriot *et al.*, 2006), les cafés de type Robusta (*Coffea canephora*) sont quant à eux presque exclusivement traités par voie sèche.

Le troisième concerne le terroir, c'est à dire la conjonction exercée par les conditions pédologiques, l'altitude, l'ombrage, la température et la disponibilité en eau pendant la période de maturation des fruits. Par exemple chez *C. arabica*, les teneurs d'acides chlorogéniques et en lipides totaux augmentent avec l'altitude (Decazy *et al.*, 2003; Avelino *et al.*, 2005). De même, il est connu que les cafés cultivés sur les sols volcaniques sont plus acides avec plus de corps et un parfum plus puissant que les autres cafés (Harding *et al.*, 1987).

Enfin, le dernier facteur non génétique concerne la physiologie de l'arbre. En effet, l'âge, les cycles de production (par exemple biannuels chez *C. arabica*), la charge en fruits (rapport source/puits évalué par le rapport feuille/fruit) mais également la position des fruits au sein d'une même plante modifient la teneur de certains composés biochimiques (Bertrand, 2002; Vaast *et al.*, 2006). Bien sur, le stade de maturation (date de récolte), souvent évalué au niveau phénologique par la couleur de l'exocarpe, influence aussi très fortement la qualité de café. Ainsi Guyot *et al.* (1988) ont montré que des cerises jaunes ou vertes de *C. canephora* sélectionnées en fin de saison de récolte donnent des grains plus matures que les cerises rouges cueillies en début de saison. Une situation inverse a été observée chez *C. arabica* où une cueillette précoce des cerises rouges conduit à un café de meilleure qualité (Bertrand, 2002).

- Facteurs génétiques

Pour la plupart des composés chimiques du grain présents en fin de maturation, on observe de variations importantes entre les espèces commerciales *C. arabica* et *C. canephora* (Table 1). Ainsi, les grains de *C. arabica* sont plus riches en lipides et en sucres (oligo- et polysaccharides) que ceux de *C. canephora*. Par contre, les grains de *C. canephora* sont plus riches en caféine et en acides chlorogéniques que ceux de *C. arabica*. Des différences peuvent également s'observer à l'intérieur de chacune des deux espèces, par exemple concernant la caféine. Ainsi, plusieurs mutants de *C. arabica* (comme le cultivar Laurina) présentant de faibles teneurs en caféine, ont

<sup>1</sup> <http://www.ico.org/prices/p2.htm>



été identifiés. Plus récemment, plusieurs plantes (notées AC1, 2 et 3) dont les grains sont totalement dépourvus de caféine, ont été caractérisées au sein d'une collection de cultivars ancestraux de *C. arabica* provenant d'Éthiopie (Silvarolla *et al.*, 2004). L'analyse de cette mutation est actuellement en cours à l'Institut Agronomique de Campinas (de Oliveira, 2007).

Chez *C. canephora*, l'utilisation de marqueurs enzymatiques a montré l'existence de plusieurs groupes génétiques (Berthaud, 1986): le groupe «Guinéen» (Guinée-Côte d'Ivoire) et le groupe «Congolais» (Congo-Cameroun-République de Centrafrique). Par la suite, l'utilisation de ces mêmes marqueurs a montré que les génotypes du groupe «Congolais» se répartissent en fait en deux sous-groupes nommés SG1 (variétés du Gabon et du sud Congo) et SG2 (génotypes sauvages du centre du Congo) (Montagnon *et al.*, 1992, Fig. 4). Cette structure géographique a été confirmée par des analyses RFLP (Dussert *et al.*, 1999). Celles-ci ont aussi montré que l'espèce *C. arabica* provient d'un croisement naturel entre *C. canephora* et *C. eugenioides* (Lashermes *et al.*, 1999). Les groupes de *C. canephora* se différencient notamment par leurs caractéristiques agro-morphologiques et organoleptiques (Table 2). Ainsi, il est intéressant de constater que les plantes des groupes Guinéen et SG1 de Congolais sont tolérantes à la sécheresse alors que celles du groupe SG2 sont sensibles à ce caractère. En revanche, la qualité organoleptique du café du groupe SG2 est plutôt bonne alors qu'elle est considérée comme médiocre en particulier pour les Guinéens. Cette diversité génétique constitue donc un atout pour l'étude du déterminisme génétique de ces différentes caractéristiques.

### C-1.3. Sur les pistes de la qualité du café...

Depuis longtemps, l'étude des arômes du café fait l'objet de nombreux travaux. Elle constitue un enjeu de recherche important, tant d'un point de vue fondamental pour comprendre quels sont les composés biochimiques du grain précurseurs de ses arômes, que d'un point de vue économique, par exemple pour garantir la qualité, l'origine ou pour l'élaboration de nouveaux produits. Aujourd'hui, on estime à environ plus de 800 le nombre de composés présents dans le café après torréfaction (Grosch, 2001; Homma, 2001). Comme l'identification, la mesure et l'impact de ces composés aromatiques sur la qualité organoleptique du café rôti sont difficiles à évaluer, une approche plus simple consiste à caractériser les précurseurs de ces composés que l'on considère comme des prédictors indirects de la qualité.

Ces prédictors sont les composés chimiques du café vert principalement les sucres, les lipides, les protéines, les acides chlorogéniques et les méthylxanthines. Ils peuvent être quantifiés facilement par les méthodes traditionnelles de chimie et les méthodes indirectes comme la spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR) (Bertrand *et al.*, 2005b). Enfin, l'utilisation de la technique de spectrométrie de masse permet aussi l'identification et la quantification des composés précurseurs de la qualité dans le café vert (Silva *et al.*, 2006). Ensemble, ces différentes techniques devraient accélérer le phénotypage à grande échelle des caféiers disponibles par exemple dans les différentes collections, permettant ainsi de mieux comprendre comment est prédéterminée la qualité organoleptique des grains.

La plupart des composés aromatiques présents à la tasse sont formés par les réactions de Maillard (1912), qui impliquent les sucres réducteurs (essentiellement le glucose) et les acides aminés libres ou bien associés sous forme de polypeptides et de protéines. Ces réactions conduisent à la formation de composés volatiles

(arômes) de faible poids moléculaire ou bien de haut poids moléculaire (PM) responsables du brunissement des aliments (les mélanoidines).

### C-1.4. Les réactions de Maillard

Ces réactions peuvent être divisées en trois étapes qui, bien que pouvant se produire dans tous les organismes (phénomènes de glycation à l'origine des «AGE» pour «advanced glycosylation end products»), sont accélérées par de fortes températures. La première correspond à une condensation entre les groupes carbonyles (-CHO) des sucres réducteurs et la fonction amine (-NH<sub>2</sub>) pour former une base de Schiff (Fig. 5A). Sauf en cas de clivage (thermique ou enzymatique) des protéines ou des polypeptides, la fonction  $\alpha$ -aminée impliquée dans la liaison peptidique ne participe pas directement à cette réaction. Par contre, le groupe  $\epsilon$ -aminé de la lysine ainsi que la fonction amine de l'asparagine et de la glutamine, sont particulièrement réactifs. La base de Schiff ainsi formée se réarrange ensuite pour former des composés dits de «Amadori» (1-amino-1-deoxy-2-cétose) ou bien de «Heyns» (2-amino-2-désoxy-1-aldose), selon que le groupe carbonyle du sucre provient respectivement d'un aldose (D-glucose, D-galactose et D-mannose, par exemple) ou d'un cétose (D-fructose, par exemple). Sous l'action de la température, les composés d'«Amadori» et de «Heyns», incolores et sans arômes, subissent une énoisation et une déshydratation qui conduit à des intermédiaires  $\alpha$ -dicarbonylés très instables capables de s'auto cycliser pour former des composés de type «furfural». Dans le cas où le groupe amine provient d'un acide aminé libre, des composés de type aminocétone sont formés (dégradation de Strecker). En revanche, si les fonctions amines proviennent de l'asparagine, de la glutamine et de la lysine, des protéines ou des polypeptides, on obtient une polymérisation qui forme des mélanoidines (Fig. 5B) caractérisées par leur couleur brun-marron.

La déamination de l'asparagine et de la glutamine produit aussi de l'ammoniaque à l'origine des hétérocycles azotés (pyrazine=25-30%, pyridines=3-7% et pyrroles=2-3%<sup>2</sup>) dont les caractéristiques sensorielles sont essentielles dans l'industrie des aliments (Maga, 1981). Plus de 80 molécules de ce type ont été identifiées chez le café (Flament, 1991), parmi lesquelles le 1,4-bis-(5-amino-5-carbonyl-1-pentyl)pyrazinium, aussi appelé CROSSPY (Hofmann *et al.*, 2001). La fonction  $\epsilon$ -amine de la lysine induit quant à elle une dégradation des sucres, aboutissant à la formation d'hétérocycles non azotés comme les pyrones et les furanes (38-45%<sup>1</sup>). Ces composés sont importants en quantité et en qualité dans les arômes de café, avec plus d'une centaine de composés déjà identifiés (Flament, 1991). Les furanes sont aussi capables de s'associer avec les atomes de soufre provenant en particulier des acides aminés cystéine et méthionine, pour former des composés<sup>5</sup> de type furfurylthiol (0,4%), thiophènes (0,4%) ou thiazole (0,15%). Bien qu'étant en quantité moins importante que les composés non soufrés, ces derniers constituent des arômes essentiels du café (Shibamoto, 1991; Mayer *et al.*, 2000). Les intermédiaires «pyrazinium» dérivés de CROSSPY sont aussi capables de former des liaisons covalentes très stables avec les fonctions thiols des mélanoidines, réduisant ainsi l'odeur «soufrée-rôtie» considérée comme indésirable (Hofmann, 1999; Hofmann *et al.*, 1999). En marge de ces réactions impliquant les groupes azotés ou soufrés des acides aminés et les groupes carbonyles des sucres, des composés de type

<sup>1</sup> : dans les extraits aromatiques de *C. arabica*, les composés aromatiques de l'ordre du ppm (1-150ppm) sont estimés à environ 170 et ceux de l'ordre du ppb (1-500 ppb) à environ 70. Dans leur ensemble, ils représentent près de 95% des arômes et se répartissent comme indiqués entre parenthèses (Silwar et Lüllman, 1993)

cyclotène et furanone provenant de la dégradation des sucres (composés aliphatiques) ont aussi identifiés dans les arômes (3-5%<sup>1</sup>) comme donnant des notes de type «caramel» (Ho *et al.*, 1993).

Enfin, le café torréfié contient de nombreux composés phénoliques (4%) qui proviennent pour partie de la lignine et des tannins contenus dans les parois cellulaires mais aussi des acides caféique et ferrulique présents sous forme libre ou d'ester (acides chlorogéniques). Leur pourcentage dans le café torréfié varie en fonction du degré de torréfaction, baissant lors des torréfactions poussées (type «Italian roasting») mais aussi en fonction des espèces, les grains verts de *C. canephora* contenant globalement plus d'acides chlorogéniques que ceux de *C. arabica* (Ky *et al.*, 2001).

Les arômes de *C. arabica* et *C. canephora* diffèrent significativement dans leur composition (Spiller, 1998). Ainsi, les teneurs en pyrazines, phénol et esters de phénols sont plus importantes chez *C. canephora* que chez *C. arabica*. Par ailleurs, *C. arabica* possède plus de composés aliphatiques (en particulier de saccharose) que *C. canephora* ce qui expliquerait les fortes teneurs en arômes de type furane et furfural constatées dans son café.

### C-1.5. Le point sur la génomique du caféier

Pour comprendre comment les précurseurs (prédicteurs indirects) des composés aromatiques s'accumulent dans le grain de caféier, il faut connaître les enzymes des voies de biosynthèse et caractériser les gènes correspondants. Or, en dépit de l'importance économique du café, on peut considérer comme très récentes les connaissances en génomique du caféier. Ainsi en 1994, date à laquelle j'ai été recruté au Centre R&D Nestlé-Tours, il n'existait qu'une seule séquence d'ADN complémentaire (ADNc) clonée chez le caféier, celle codant pour l' $\alpha$ -galactosidase (Zhu et Goldstein 1994, voir C-5.1).

Au mois de décembre 2004, seulement 1570 séquences nucléotidiques et 115 séquences protéiques de caféier étaient disponibles dans la banque de données GenBank. Ce n'est que récemment que plusieurs projets de séquençage d'EST («Expressed Sequence Tag») de caféier ont été réalisés (Table 3). Par ordre chronologique, on peut citer le projet Nestlé/Université de Cornell<sup>3</sup> (Lin *et al.*, 2005), auquel j'ai participé avant mon départ du Centre R&D Nestlé-Tours, qui a permis le séquençage d'environ 47000 ESTs à partir de fruits (à différents stades de développement) et de feuilles de plusieurs clones de *C. canephora* provenant de l'ICCRI (Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute)<sup>4</sup>. Vient ensuite le projet de l'IRD avec le séquençage de plus de 10400 ESTs provenant également de fruits de *C. canephora* à différents stades de maturation (5800 ESTs) et de feuilles de la même espèce (4600 ESTs) (Poncet *et al.*, 2006). Enfin, le projet «Genoma café» coordonné conjointement par l'Unicamp<sup>5</sup> et le centre Cenargen de l'Embrapa, a permis l'obtention de plus de 150000 ESTs à partir de trois espèces différentes de *Coffea*: *C. arabica*, *C. canephora* et *C. racemosa* (Vieira *et al.*, 2006). Afin d'identifier le plus possible de gènes, plus de 40 bibliothèques d'ADNc ont été construites durant ce projet, certaines à partir de plantes ou de matériels (cals, cellules en suspension...) soumis à différents stress biotiques et abiotiques. Après regroupement («clusterization»), 17982 contigs et 32155 singletons ont été formés. Contrairement aux projets Nestlé/Cornell et IRD, les séquences EST du projet «Genoma café» n'ont pas encore été déposées dans le domaine public. L'accès à ces dernières est donc réservé aux laboratoires brésiliens membres du Consortium

<sup>3</sup> <http://www.sgn.cornell.edu/content/coffee.pl>

<sup>4</sup> <http://www.iccri.net/>

<sup>5</sup> <http://www.unicamp.br/>

R&D café, ou bien à travers des collaborations scientifiques établies avec les institutions brésiliennes, comme c'est le cas des partenariats réalisés par le Cirad avec le IAPAR (2002-2011) et l'Embrapa (2006-2009).

## C-2. Le développement du grain de caféier

Plusieurs études ont montré que le périsperme provenant du nucelle diploïde est le tissu qui se développe juste après la fécondation de l'ovule de la fleur de caféier (Winton et Winton, 1939; Vishveshwara et Chinnappa, 1965; Wormer, 1966). Par la suite, le périsperme occupe tout l'espace intérieur (locule) des fruits délimité par l'endocarpe (également appelé parche) jusqu'à environ 90-100 Jours Après la Floraison [JAF] (Fig. 6) (Geromel *et al.*, 2006). Après 120 JAF, l'espace occupé par le périsperme est ensuite rapidement remplacé par l'endosperme qui croît à l'intérieur du périsperme. Au stade mature, qui varie selon les espèces de quelques semaines (10 à 12) chez *C. racemosa* et *C. pseudozanguebariae*, à plusieurs mois pour *C. arabica* et *C. canephora*, le périsperme n'est plus réduit qu'à une fine couche de cellules entourant l'endosperme désignée sous le nom de pellicule argentée (Fig. 7).

En collaboration avec le groupe du Pr P. Mazzafera (Unicamp), les analyses histologiques réalisées au cours du développement du fruit de caféier ont pour la première fois permis de préciser les interactions entre les différents tissus du grain. Ainsi, on observe que le périsperme est toujours étroitement relié à l'endocarpe par le funicule (pédicelle) (Fig. 8A). Cette situation persiste tout au long du développement du fruit même lorsque le périsperme est présent sous la forme de pellicule argentée (Fig. 8C). À la frontière funicule/périsperme, on constate une continuité symplastique entre les tissus vasculaires (xylème et phloème) et le périsperme alors qu'aucun raccordement vasculaire n'est observé entre le péricarpe et le périsperme. Par ailleurs, l'épiderme de ce dernier faisant face à l'endocarpe, présente une couche pseudo-cuticulaire non présente à l'interface périsperme/endosperme (Fig. 8B). Par analogie avec la structure d'autres graines, cette cuticule doit donc former une barrière imperméable aux transferts apoplastiques, isolant l'apoplaste de la graine du périsperme et limiter ainsi les transferts passifs de solutés (Patrick et Offler, 1995, pour revue).

Même si les grains matures de caféier n'accumulent pas d'amidon, des granules de ce composé sont présents dans le périsperme mais pas dans ses couches cellulaires localisées à proximité de l'endosperme (Fig. 8D). Cette observation est en accord avec les travaux de Salmona *et al.* (2008) qui montrent une forte expression du gène de la synthétase d'amidon dans les stades précoces (spécifiques du périsperme) du développement du grain puis une décroissance progressive de l'expression de ce gène avec la maturation. Le fait que l'amidon périspermique ne soit pas détecté à proximité de l'endosperme suggère qu'il est hydrolysé, par exemple pour fournir l'énergie nécessaire à la multiplication et à l'élongation des cellules endospermiques. Cette source d'énergie pourrait également servir pour la synthèse des protéines et des polysaccharides de stockage que l'on constate entre 120 et 150 JAF (Fig. 9). Les expériences de pulse-chasse réalisées en appliquant du  $^{14}\text{C}$ -saccharose ou du  $^{14}\text{C}$ -fructose sur le pédoncule de fruits isolés à 120 JAF, montrent justement l'existence de transferts de sucres, en particulier du périsperme vers l'endosperme, qui nécessitent la synthèse et la dégradation simultanée de saccharose dans ces tissus (Geromel *et al.*, 2006). Dans leur ensemble, ces observations renforcent le rôle du périsperme comme tissu essentiel pour fournir tout ou partie des précurseurs nécessaires pour la synthèse des composés biochimiques accumulés au stade mature du grain de caféier (Rogers *et al.*, 1999b).

En raison de l'origine sporophytique du péricarpe, on peut supposer que le génome maternel pourrait contrôler les caractéristiques physiques finales des grains de café, comme la taille finale par exemple (Rogers *et al.*, 1999b). Même si l'étude comparative menée sur la croissance des grains récoltés à partir de plantes cultivées en pleine lumière et sous ombrage montre clairement que l'augmentation de la taille finale des grains sous ombrage est la conséquence du développement plus important du péricarpe (Geromel *et al.*, 2008b), aucun effet maternel sur ce caractère n'a toutefois été observé chez *C. arabica* (B. Bertrand, communication personnelle) et *C. canephora* (T. Leroy et C. Montagnon, communication personnelle).

### C-3. Les protéines de réserve: précurseurs d'arômes

Chez le cacaoyer, l'importance des protéines de réserve comme précurseurs essentiels des arômes et des saveurs est connue depuis longtemps (Biehl *et al.*, 1982, 1985). Ces précurseurs apparaissent après l'étape de fermentation acide de la pulpe des fèves par les microorganismes. Parallèlement à cette acidification, on observe une hydrolyse des protéines de réserve de type 7S (vicilline) qui dépend de l'action successive de protéases aspartiques et de carboxypeptidases (Voigt *et al.*, 1994). Les peptides et acides aminés hydrophobes issus de cette hydrolyse constituent les précurseurs d'arômes du cacao (Rohan 1964, Kirchhoff *et al.*, 1989) qui ne s'exprimeront totalement qu'après torréfaction des fèves préalablement séchées.

Chez le caféier, l'importance des protéines de réserves et des acides aminés comme précurseurs des arômes a également été rapportée (Amorim *et al.*, 1975; Arnold et Ludwig, 1996; Melo et Amorim, 1975). Dans le grain vert, les teneurs en protéines sont relativement élevées (Macrae, 1985) et varient selon les espèces de 4,7% du poids sec des grains chez *C. racemosa* à 9,1% chez *C. liberica*, avec des valeurs intermédiaires et similaires (7,8% du poids sec) pour les espèces commerciales *C. arabica* et *C. canephora* (Clifford, 1985; Baú *et al.*, 2001). En revanche, les teneurs en acides aminés libres dans le grain vert sont beaucoup plus basses (0,3 à 0,6% du poids sec) (Arnold *et al.*, 1994). Parmi ceux-ci, l'acide glutamique et l'asparagine sont les plus abondants et représentent près de 40 % d'acides aminés libres (Poisson, 1977; Arnold *et al.*, 1994; Arnold et Ludwig, 1996). Ils sont d'ailleurs les formes principales de transport d'azote dans la sève du caféier (Mazzafera et Gonçalves, 1999). Quelques différences existent dans la composition des acides aminés libres des grains de café verts entre les espèces de *Coffea*. Ainsi, le contenu d'acide glutamique est plus élevé chez *C. arabica* que chez *C. canephora* (Arnold *et al.*, 1994).

Dans le grain torréfié, les protéines sont dénaturées et complexées à des quinones pour former les mélanoïdines (Montavon *et al.*, 2003). Bien que dans ce cas on ne puisse pas parler de teneur protéique, les teneurs d'acides aminés obtenus après hydrolyse sont estimées à environ 10% et varient avec la torréfaction, les proportions des acides aminés arginine, cystéine, histidine, lysine, sérine et thréonine étant significativement plus basses dans le grain rôti que dans le grain vert (Arnold et Ludwig, 1996). Ludwig *et al.* (2000) ont également identifié la présence de peptides de faible PM (s'étendant de 4 à 12,5 kDa) qui s'accumulent différemment dans les grains verts de *C. arabica* et de *C. canephora*. Bien que l'origine de ces polypeptides soit inconnue, il est probable qu'ils correspondent à des produits de dégradation des protéines de réserve sous l'action de protéases (Silva *et al.*, 2005). Celles-ci ont été mises en évidence dans les grains verts de ces deux

espèces (Ludwig *et al.*, 2000) et pourraient être responsables des teneurs en acides aminés plus élevées habituellement détectées dans les grains de café traités par voie humide (Casal *et al.*, 2001; Selmar *et al.*, 2001).

Plus de 1800 ESTs codant pour différents types de protéases ont été identifiés dans le projet «Genoma café» (Baptista *et al.*, 2005). Par ailleurs, McCarthy *et al.* (2004) rapportent dans le brevet WO 2004/113520, le clonage des ADNc de deux protéases à cystéine (CcCP-1 et CcCP-4) et de deux protéases aspartiques (CcAP-1 et CcAP-2) exprimés dans le grain de *C. canephora*. La disponibilité de ces séquences devrait maintenant permettre de préciser l'influence des facteurs environnementaux (Silva *et al.*, 2005) et des traitements post-récolte (Selmar *et al.*, 2001) sur le rôle de ces enzymes dans l'élaboration de la qualité organoleptique du café.

### C-3.1. Les protéines de réserves du caféier sont des légumine

En 1994, nous avons donc entrepris une première étude visant à caractériser les protéines de réserve du grain de caféier à la fois par une approche protéomique et moléculaire. Avec mon collègue John Rogers, j'ai caractérisé ces protéines et suivi leur accumulation au cours de la maturation du grain de caféier par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE: Fig. 10). Cette caractérisation a été réalisée par séquençage (INRA Nouzilly) des protéines extraites de ces gels, à partir de l'extrémité N-terminale des protéines natives ou bien par séquençage N-terminal de polypeptides obtenus après digestion trypsique des protéines natives. Ces résultats ont montré que les protéines de réserve de *C. arabica* appartiennent à la famille des globulines de type 11S, identiques à celles rencontrées dans l'albumen des graines de nombreuses dicotylédones (Shewry, 1995). Elles sont synthétisées sous la forme d'un précurseur ayant un PM d'environ 55 kDa qui est ensuite clivé au niveau du site N/GLEET pour libérer deux sous-unités appelées  $\alpha$  (chaîne acide de 32 kDa) et  $\beta$  (chaîne basique de 22 kDa) reliées entre elles par pont disulfure (Fig. 11) impliquant des cystéines conservées.

L'analyse par gel 2-DE des protéines présentes chez le grain mature permet d'identifier très clairement ces différentes formes protéiques ainsi que des tétramères de la sous unité  $\beta$  et plusieurs polypeptides de faible PM (12 à 16 kDa) provenant probablement de la dégradation de la sous-unité  $\alpha$  (Fig. 10). On observe également la présence de plusieurs isoformes de ces protéines 11S qui sont caractérisées par des PM identiques mais par des points isoélectriques (pI) variables. Ces variations de pI s'observent également pour les précurseurs et les formes tétramériques de  $\beta$ . A partir de ces gels 2-DE, l'intégration des signaux (intensité de coloration) des protéines de réserve a permis d'estimer leur quantité à 45% dans le grain mature (35 Semaines Après la Floraison [SAF]) de *C. arabica* L. cv. Caturra 2308 (Rogers *et al.*, 1999a). Des résultats similaires ont été obtenus simultanément à la publication de nos travaux par Acuña *et al.* (1999) dans les grains du cultivar Colombia de *C. arabica*.

En revanche, les profils de gel 2-DE de grains matures de *C. canephora* (issus du croisement : clone FPRC8 «congolais» [♀] x clone ougandais 3484 [♂]) révèlent la présence de précurseurs ayant des PM supérieurs (55-60 kDa) et des pI légèrement plus acides que ceux observés chez de *C. arabica* (Rogers *et al.*, 1999a). Cette différence se traduit également par l'apparition de sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  plus acides que celles de *C. arabica*. Baú *et al.* (2001) rapportent aussi l'existence de plusieurs isoformes de protéines 11S qui se différencient par des PM légèrement différents notamment chez les espèces non cultivées *C. buxobensis* et *C. eugenoides* (3 plantes) mais aussi chez *C. canephora* var. Kouillou. Même si on ne dispose pas d'analyses phylogénétiques permettant de définir l'origine des plantes de *C. canephora* var. Kouillou, celles-ci sont probablement apparentées au groupe

congolais de *C. canephora* (Montagnon *et al.*, 1998; Montagnon, 2000). Par ailleurs, il est intéressant de constater que les profils 2-DE des protéines 11S de grains matures de plantes de *C. canephora* appartenant au groupe des guinéens s'apparentent plus aux profils communément observés chez *C. arabica*, qu'à ceux du groupe congolais de *C. canephora* (résultats non publiés). Comme ces différents groupes de *C. canephora* se différencient entre autres caractéristiques, par la qualité organoleptique du café à la tasse (Montagnon *et al.*, 1998), l'existence de cette variabilité au sein des protéines 11S entre ses espèces et groupes de *Coffea* mériterait certainement une analyse plus approfondie.

Après la mise au point des protocoles d'extraction d'ARN de grain de caféier, j'ai isolé un ADNc pleine longueur (nommé *CaCSP1* pour *C. arabica* Coffee Storage Protein) codant pour l'une de ces protéines qui a été cloné par criblage d'une banque d'ADNc de fruits en cours de maturation. A quelques exceptions, l'analyse de la protéine déduite de cet ADNc permet de retrouver les séquences de plusieurs polypeptides purifiés à partir des gels 2-DE. Au même moment, Acuña *et al.* (1999) ont également rapporté le clonage de deux ADNc de protéines 11S de *C. arabica*. cv. Colombia très similaires à l'ADNc *CaCSP1*. Plus récemment, 687 et 141 séquences EST similaires (>98% d'identité) à l'ADNc *CaCSP1* ont été identifiés respectivement au sein des projets Nestlé/Cornell (Lin *et al.*, 2005) et «Genoma café» (De Castro et Marraccini, 2006). Dans tous les cas, les protéines 11S du caféier déduites de ces séquences présentent toutes de fortes homologues ( $\approx$  45% identité) principalement avec les protéines de réserve du colza (*Brassica napus*), de la vesce commune (*Vicia sativa* L.), du riz (*Oryza sativa*), mais aussi avec les protéines 11S/12S de la tomate et d'*Arabidopsis thaliana*.

### C-3.2. Les protéines de réserves et le développement du grain

L'évolution des protéines 11S au cours de la maturation du grain de caféier de *C. arabica* L. cv. Caturra 2308 a été analysée par Northern-blot. Nos travaux ont montré que les ARNm *CaCSP1* sont détectés au moment de l'apparition des protéines 11S, c'est à dire vers la 18<sup>ème</sup> SAF (Marraccini *et al.*, 2001a; De Castro et Marraccini, 2006). On constate également un couplage étroit entre la transcription et la traduction du gène *CaCSP1* (Fig. 12). Par contre, ces ARNm sont indétectables dans les grains jeunes (entre 4 et 14 SAF) ainsi que dans les grains matures (35 SAF). Plus récemment, l'expression du gène *CaCSP1* au cours du développement de grains de *C. arabica* a été analysée par la technique de PCR quantitative (Simkin *et al.*, 2006). Même si dans ce travail, aucune information n'est fournie sur le nombre de jours séparant les prélèvements des grains de la date de floraison, ces résultats montrent que l'expression du gène *CaCSP1* est maximale au stade LG (grain large) puis décroît aux stades YG (grain jaune) et RG (grain mature). Par la même approche, mais en utilisant des stades phénologiques mieux décrits, Salmona *et al.* (2008) ont montré que le pic l'expression du gène *CaCSP1* est effectivement observé lors de la phase d'expansion de l'endosperme du cultivar Laurina de *C. arabica*., en même temps que les pics d'expression des gènes codant les protéines de réserves 7S et 2S, certaines oléosines (OLE-2 et STO-1) et les enzymes de la voie de biosynthèse des polysaccharides comme la  $\beta$ -1,4 mannane synthétase par exemple. Chez *C. canephora*, l'expression du gène *CSP1* semble apparaître plus tardivement avec un maximum au stade grain jaune (YG) pour décroître au stade mature (RG) (Lin *et al.*, 2005; Simkin *et al.*, 2006). Ces observations divergent avec celles faites chez *C. arabica* mais peuvent s'expliquer par les temps de maturation différents entre les deux espèces.

En dépit de ces résultats, il est néanmoins difficile d'affirmer que l'expression du gène *CSP1*, est spécifique *sensu stricto* de l'endosperme. En effet, dans toutes ces analyses d'expression et y compris lors de la construction des banques d'ADNc des différents projets EST, ce sont les grains entiers (comprenant le périsperme et l'embryon en plus de l'endosperme) qui ont été utilisés. Or les protéines 11S sont aussi détectées dans les embryons zygotiques disséqués à partir des grains matures (Rogers et Marraccini, non publié) comme dans les embryons somatiques (Yuffá *et al.*, 1994). Chez *C. arabica*, la masse de l'embryon peut être estimée comme négligeable entre 18 et 27 SAF puisque celui n'est identifiable (facilement séparable de l'endosperme) qu'au stade mature (Eira *et al.*, 2006). De même chez cette espèce, le pourcentage du périsperme dans la composition du poids frais du grain décroît de 20 à 5% entre 18 et 27 SAF (Fig. 6B). Même si l'expression de certains gènes du métabolisme des sucres et la présence de fortes activités enzymatiques ont été démontré dans les derniers stades de développement du périsperme (Geromel *et al.*, 2006; Geromel *et al.*, 2008b), l'ensemble de ces résultats suggèrent néanmoins que le gène *CaCSP1* s'exprime majoritairement dans l'endosperme (De Castro and Marraccini, 2006). En revanche, aucune expression du gène *CSP1* n'est détectée dans le péricarpe en cours de développement aussi bien chez *C. arabica* que chez *C. canephora* (Simkin *et al.*, 2006), ni dans les feuilles, les fleurs, les tiges et les racines de *C. arabica* (De Castro et Marraccini, 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que le promoteur de ce gène pourrait être un bon outil moléculaire pour diriger spécifiquement dans l'endosperme, l'expression de gène sous sa dépendance (Etienne *et al.*, 2002).

### C-3.3. Le promoteur du gène *CSP1*: un premier outil moléculaire?

Dans la littérature, il existe de nombreux exemples citant l'utilisation de promoteurs de gènes de protéines de réserve pour diriger l'expression de transgènes spécifiquement dans les graines de plantes transgéniques. Parmi ceux-ci, on trouve le promoteur du gène de la phaséoline (7S) (Doyle *et al.*, 1986) et de la légumine (11S) (Shirsat *et al.*, 1998) de *Phaseolus vulgaris*, de l'hélianthine du tournesol (Bogue *et al.*, 1990), de la gluténine du blé (Stöger *et al.*, 1999) et de la zéine de maïs (Scherthaner *et al.*, 1988) pour ne citer que quelques exemples. Sur cette base, on pourrait envisager d'utiliser un promoteur spécifique du grain de caféier par exemple pour modifier sa teneur en caféine ou bien pour exprimer dans le grain un gène permettant de limiter le développement du scolyte des baies (*Hypothenemus hampei*), principal insecte ravageur du caféier. Le travail concernant le clonage du gène *CaCSP1* et l'analyse fonctionnelle de son promoteur s'inscrit dans cet objectif. Cela a nécessité l'introduction des techniques de transformation génétique du tabac au Centre R&D Nestlé dont j'ai assumé la responsabilité.

Comme cité précédemment, les gels 2-DE de grains de *C. arabica* montrent la présence de plusieurs isoformes de protéines 11S avec une complexité d'ailleurs accrue dans les grains de *C. canephora* apparentées au groupe congolais. Comme ces isoformes ont des PMs très semblables, cette diversité s'explique probablement par l'existence d'une famille multigénique codant les protéines 11S plus que par des modifications post-traductionnelles. Or de manière très surprenante, toutes les expériences d'hybridation moléculaire visant à estimer le nombre de gènes 11S suggèrent la présence d'un gène 11S unique, à la fois chez *C. arabica* (Rogers *et al.*, 1999a), *C. canephora* (Lin *et al.*, 2005) et chez d'autres espèces de *Coffea* (Acuña *et al.*, 1999). Cette observation, qui est en contradiction avec l'existence de plusieurs ADNc 11S, mériterait une étude des gènes codant pour ces



protéines, par exemple en réalisant le séquençage des ADNc ou des gènes codant ces protéines et en analysant du polymorphisme de ses séquences au sein de plantes de différentes origines de *C. canephora*.

A partir de la séquence de l'ADNc pleine longueur *CaCSP1*, le gène correspondant a été isolé (Marraccini *et al.*, 1999; Fig. 11). En utilisant la technique de PCR inverse (Ochman *et al.*, 1988) qui m'avait permis de cloner avec succès le promoteur du gène *gln1a* de *Pinus sylvestris* codant l'isoforme cytosolique (GS1) de la glutamine synthétase (Avila *et al.*, 2001, 2002), une séquence de plus de 1000pb localisé en amont de l'extrémité 5' de ce gène a également été clonée. Son analyse révèle la présence de nombreuses boîtes (« DNA boxes ») caractéristiques des promoteurs spécifiques de protéines de réserve (Goldberg *et al.*, 1989; Shirsat, 1991). La fonction de cette séquence a été testée en construisant des délétions décroissantes de son extrémité 5' (945, 695, 445 et 245 pb) qui ont été clonées indépendamment dans le vecteur binaire de transformation pBI101, en amont du gène rapporteur *uidA* codant pour l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase (GUS), puis introduites dans le tabac (*Nicotiana tabacum* var. XHFD8) par agro-infection. Dans tous les cas, aucune expression du gène rapporteur GUS n'a été détectée dans les feuilles (Fig. 13) et les racines des plantes transformées. Par contre, on observe de fortes activités GUS dans l'endosperme et embryon (résultat non publié) des graines des plantes contenant les fragments de 945 et 695pb du promoteur du gène *CaCSP1*. Ces activités GUS décroissent ensuite proportionnellement avec la taille des séquences testées. Ces résultats montrent que le promoteur du gène *CaCSP1* de *C. arabica* fonctionne comme un promoteur spécifique du grain dans *N. tabacum*.

Afin de vérifier si cette séquence peut également contrôler l'expression de gènes dans le grain de caféiers transgéniques, plusieurs constructions utilisant les fragments de 945pb et de 245pb du promoteur 11S ont été réalisées par exemple pour essayer de réduire (stratégie antisens) l'expression du gène codant pour l' $\alpha$ -galactosidase (Marraccini *et al.*, WO 03/032713, voir C-5.1.). Au début de l'année 2000, ces constructions ont été introduites dans des cellules de caféier en suspension par la technique d'agro-infection (Leroy *et al.*, 2000) et plusieurs dizaines de plantules transformées ont été sélectionnées puis transférées en serre. Dans ces conditions, on peut espérer une première floraison au mieux trois ans après l'acclimatation des plantules. Compte tenu de mon départ du Centre R&D Nestlé-Tours en fin d'année 2001, je ne dispose pas des résultats de ces analyses qui n'ont pas été publiés et font toujours l'objet d'une demande de brevet.

Par contre, Kumar *et al.* (2007) ont récemment montré que le fragment long du promoteur 11S est capable de diriger l'expression du gène rapporteur *uidA* dans les embryons et des fragments d'endosperme de *C. canephora* transformés par électroporation. Ce résultat confirme la fonction de cette séquence dans des cellules de caféier et permet d'envisager son utilisation pour modifier l'expression de gènes s'exprimant dans les grains (De Castro et Marraccini, 2006). Depuis ce travail, d'autres promoteurs spécifiques de l'endosperme de caféier, qui pourraient aussi être utilisés à des fins biotechnologiques, font également l'objet de demandes de brevets (Hinniger *et al.*, 2006; Simkin *et al.*, 2006).

#### C-4. Caractérisation du gène *rbcS* de *Coffea arabica* L.

Au cours des 15 dernières années, des avancées considérables ont été faites dans le domaine des biotechnologies du caféier, en particulier concernant l'efficacité des techniques de transformation génétique (Ribas *et al.*, 2006a, pour revue). Plusieurs groupes ont ainsi pu régénérer des caféiers transformés résistants à la

mineuse des feuilles *Perileucoptera coffeella* (Leroy *et al.*, 2000), au glufosinate (Ribas *et al.*, 2006b), avec une teneur réduite en caféine (Ogita *et al.*, 2004, 2005) ou pour synchroniser la maturation des fruits (Ribas *et al.*, 2003, 2005). Parallèlement, la recherche d'outils moléculaires permettant d'optimiser l'expression des transgènes dans les caféiers transgéniques a été entreprise par plusieurs équipes (Stiles, 2001).

Parmi les précurseurs essentiels pour l'élaboration des arômes du grain de caféier, nombreux sont synthétisés dans les tissus photosynthétiques, principalement dans les feuilles mais aussi dans le péricarpe du grain (Vaast *et al.*, 2005; De Castro et Marraccini, 2006). C'est le cas du saccharose (Geromel *et al.*, 2006), de la caféine (Frischknecht *et al.*, 1986; Ashihara *et al.*, 1996; Zheng and Ashihara, 2004), des acides chlorogéniques (Bertrand *et al.*, 2003) et des trigonelines (Zheng *et al.*, 2004; Zheng and Ashihara, 2004). Pour modifier ces voies métaboliques ou afin de diriger l'expression de gènes d'intérêt (Leroy *et al.*, 2000) spécifiquement dans les feuilles (et pas dans les grains !), il est donc pertinent de disposer de promoteurs spécifiques des tissus photosynthétiques. Le travail concernant le clonage du gène *rbcS* s'inscrit dans le stage de DIU Biotechnologies Végétales, Université Paris XI de Carine Courjault.

Plusieurs travaux montrent l'efficacité du promoteur *SSU* pour diriger l'expression de transgènes dans les feuilles des plantes transformées (Stalker *et al.*, 1988; Worrell *et al.*, 1991; Galtier *et al.*, 1993; Gittins *et al.*, 2000; Migge *et al.*, 2000). Chez le caféier *C. arabica*, cette spécificité s'observe par la présence de la petite sous-unité de la Rubisco (unité RBCS) dans les feuilles (Fig. 14) alors que cette protéine est toujours absente dans les tissus non-photosynthétiques comme les racines, les embryons somatiques ou l'endosperme (Marraccini *et al.*, 2003). L'ADNc *CaRBCS1* codant pour cette protéine ainsi que le gène correspondant ont été clonés. Les études d'expression confirment les résultats des analyses protéiques (gels 2-DE) puisque les transcrits *CaRBCS1* sont détectés dans les feuilles mais absents dans tous les autres organes testés (bourgeons floraux, fleurs, tiges et racines). En revanche, le gène *CaRBCS1* s'exprime dans le péricarpe des grains en même temps que les gènes codant pour d'autres protéines plastidiales (Salmona *et al.*, 2008). Ceci est en accord avec les observations histologiques qui montrent l'accumulation d'amidon dans ce tissu (voir C-2. et Fig. 8) et suggère un processus actif de photosynthèse au sein du péricarpe.

Un fragment d'environ 1000 pb localisé en amont de l'extrémité 5' de l'ADNc *CaRBCS1* a également été isolé. Son analyse révèle la présence de plusieurs boîtes connues pour fixer des facteurs transcriptionnels impliqués dans la photorégulation de l'expression génique (Lam et Chua, 1990; Fluhr, 1993; Argüello-Astorga et Herrera-Estrella, 1998). La fonction de cette séquence a été vérifiée par transformation dans le tabac (Fig. 15) : les activités GUS montrent une forte expression du gène *uidA* dans les feuilles et l'absence totale d'expression dans les racines ainsi que dans les graines des plantes transformées (résultat non publié). Pour cinq transformants, on observe également une nette réduction de l'activité GUS dans les feuilles des plantes maintenues à l'obscurité pendant 24h, montrant ainsi que ce fragment contient toutes les séquences nécessaires pour assurer à la fois sa spécificité et sa photorégulation. A ce jour, aucun travail consistant à utiliser ce promoteur pour contrôler l'expression d'un transgène dans des feuilles de caféiers transgéniques n'a été initié.

## C-5. Etude du métabolisme des polysaccharides

Comme mentionné précédemment, il existe plusieurs définitions de la qualité du grain de caféier selon les acteurs de la filière. Du point de vue de Nestlé, premier acheteur de café vert sur les marchés internationaux avec 12% de la production mondiale, un critère essentiel de la qualité des grains concerne l'extraction qui est définie par le pourcentage de matière sèche obtenue à l'issu des processus de torréfaction et de lyophilisation en relation à la quantité de grains verts. Celui ci est généralement proche de 52% pour les grains de *C. canephora* et de 48% pour ceux de *C. arabica* (V. Leloup, communication personnelle). Si tous les solutés présents dans le cytoplasme des cellules sont extraits lors du processus d'extraction, il n'en est pas de même pour les polysaccharides complexes qui entrent dans la composition de la paroi cellulaire. Ces derniers représentent approximativement 48% de poids sec du grain de café vert prêt à être torréfié et se répartissent de la manière suivante (Bradbury 2001; Redgwell *et al.*, 2002): (galacto)mannanes (50%), arabinogalactannes (30%), cellulose (15%) et pectines (5%).

Les facteurs qui influencent la solubilité des mannanes (Fig. 16) sont la longueur de la chaîne de mannanes (M) et le degré de branchement en résidus galactosyl (G). Ainsi, les galactomannanes les plus solubles sont ceux de *Trigonella foenum-graecum* (le fenugrec) avec un rapport Gal/Man = 1/1 (Reid *et al.*, 1995). A l'opposé, les mannanes contenu dans la noix d'ivoire (fruit du palmier *Phytelephas aequatorialis*) sont parmi les plus purs, sans aucun galactose et donc complètement insolubles. Le degré de branchement en résidus galactosyl sur la chaîne de mannanes du grain de caféier est également bas, avec des rapports de Gal/Man variant de 1:130 (Bradbury et Haliday, 1990) à 1:30 (Fischer *et al.*, 2001). Cette dernière valeur a été confirmée par une analyse chimique détaillée des galactomannanes extraits à différentes étapes du développement de grain de café (Redgwell *et al.*, 2003). Lors de cette étude, il a également été montré que le rapport Gal/Man des (galacto)mannanes est haut (entre 1:2 et 1:7) lors des stades initiaux de développement de l'endosperme (vers 11 SAF) et diminue avec la maturation pour atteindre des valeurs proches de 1:40 au stade mature. Ces changements des rapports du Gal/Man se produisent lorsque le périsperme est graduellement remplacé par l'endosperme, phénomène qui s'accompagne du durcissement de l'endosperme (De Castro et Marraccini, 2006).

Dans le grain vert, ces mannanes sont donc faiblement substitués en résidus galactosyl et donc insolubles. Ils sont responsables de la plupart des pertes importantes lors du processus de fabrication du café soluble (Clifford, 1985). Ils représentent aussi 97 % de gels qui se forment pendant le stockage des «liqueurs» café et 60% des sédiments responsables de l'opacité et de la précipitation des boissons à base de café (Bradbury et Atkins, 1997). Au total, on estime à environ 12% le pourcentage de poids de grain de café perdu sous la forme de mannanes insolubles lors du processus d'extraction pour la fabrication de café soluble (V. Leloup, communication personnelle).

Il existe plusieurs enzymes responsables de la dégradation des galactomannanes (Reid et Meier, 1973) . Parmi celles-ci, il est connu que l' $\alpha$ -D-galactosidase ( $\alpha$ -Gal: EC 3.2.1.22) intervient conjointement avec les (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -mannanes endohydrolases (endo- $\beta$ -1-4-D-mannanohydrolase, EC 3.2.1.78) et les  $\beta$ -mannosidases (EC 3.2.1.25) pour dégrader les galactomannanes durant la germination des graines. Dans plusieurs espèces comme chez *Senna occidentalis*, l'augmentation de l'activité  $\alpha$ -D-galactosidase pendant la maturation est corrélée avec un rapport décroissant de Gal/Man des galactomannanes et le durcissement des graines (Edwards *et al.*, 1992). Par ailleurs, l' $\alpha$ -D-galactosidase des grains de café a été l'une des premières  $\alpha$ -Gal végétale à être partiellement

purifiée et caractérisée biochimiquement (Courtois et Petek, 1966; Carchon et De Bruyne, 1975; Haibach *et al.*, 1991; Golden *et al.*, 1993). L'endo- $\beta$ -mannanase est quant à elle responsable de la dégradation des mannanes dans les tissus de stockage (McCleary, 1983; Bewley, 1997). En effectuant une hydrolyse interne des polymères mannanes, cette enzyme augmente ainsi la solubilité des mannanes. Elle est associée principalement au processus de germination des graines comme chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) où elle est nécessaire pour favoriser l'émergence de la pointe radiculaire et l'expansion de l'embryon (Nonogaki *et al.*, 1995; 2000). Chez le caféier, une activité endo- $\beta$ -mannanase a été détectée lors la germination *in vitro* des grains (Giorgini et Comoli, 1996). Parallèlement, la possibilité d'utiliser une forme immobilisée endo- $\beta$ -mannanase d'*Aspergillus niger* pour traiter des extraits de café lors du processus de fabrication du café lyophilisé a été envisagée (Nicolas *et al.*, 1994).

Ces résultats nous ont donc incités à initier les travaux sur ces deux enzymes en particulier pour caractériser les séquences de leurs ADNc correspondants, premier pas indispensable avant d'envisager utiliser ces séquences pour d'autres applications technologiques.

### C-5.1. L' $\alpha$ -galactosidase du grain de caféier

Les premières études portant sur l' $\alpha$ -D-galactosidase ( $\alpha$ -Gal) des grains de caféier ont montré que cette enzyme existe sous la forme de deux isoformes qui diffèrent par leur PM (28 and 36.5 kDa), les pH optimums d'activité (5,3 and 6,3) et des pI différents (Courtois et Petek, 1966; Carchon et De Bruyne, 1975; Haibach *et al.*, 1991; Golden *et al.*, 1993). Elle est très abondante dans le grain de café mature d'où elle est justement purifiée à des fins commerciales (Sigma, réf. G8507). Contrairement aux  $\alpha$ -Gal microbiennes (*A. niger*, *S. carlsbergensis* et *E. coli*), l'enzyme du caféier présente la particularité d'ôter les unités terminales de galactose liées en  $\alpha 1 \rightarrow 3$  des complexes carbohydrates-glycoprotéines présent à la surface des érythrocytes du groupe sanguin B pour les transformer en globules rouges de type O (Yatsiv et Flowers, 1971). Cette caractéristique, particulièrement intéressante pour résoudre les problèmes de transfusion sanguine, est à l'origine du clonage de l'ADNc de l' $\alpha$ -Gal du caféier par une équipe du New-York Blood Center (Zhu et Goldstein, 1994) en particulier pour surproduire cette enzyme recombinante dans plusieurs systèmes hétérologues (Zhu *et al.*, 1995a; Zhu et Wang, 1996). A partir de cette séquence d'ADNc, (la première de caféier qui ait été clonée), on déduit que l'enzyme est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 420 résidus amino acides qui, après plusieurs clivages N-terminaux, aboutit à la forme active contenant 363 acides aminés pour un PM d'environ 40 kDa. Ce même ADNc a été utilisé pour identifier les acides aminés essentiels à l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -Gal par mutagenèse dirigée (Zhu *et al.*, 1995b; Zhu *et al.*, 1996; Maranville et Zhu, 2000a, 2000b).

Nos travaux ont montré que pour un même cultivar (*C. arabica* cv. Caturra 2308), on observe des niveaux d'activités  $\alpha$ -Gal plus importants dans les grains de plantes cultivées en plein champ que dans ceux provenant de plantes en serre (Marraccini *et al.*, 2005). Par ailleurs, la comparaison des activités  $\alpha$ -Gal entre les espèces de caféier montre des activités plus importantes dans les grains de *C. arabica* que dans ceux de *C. canephora*. Quelques soient les espèces étudiées, les cinétiques enzymatiques présentent systématiquement un maxima qui coïncide avec la phase de durcissement de l'endosperme (vers 25-27<sup>ème</sup> SAF pour *C. arabica* et la 35-45<sup>ème</sup> SAF pour *C. canephora*). On observe aussi une augmentation régulière de l'activité  $\alpha$ -Gal au cours de la germination des grains de café *in vitro*, confirmant l'importance de cette enzyme dans ce processus (Feurtado *et al.*, 2001).

Comme proposé par Obendorf *et al.* (1997), cette forte activité  $\alpha$ -Gal pourrait être nécessaire pour dégrader les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs). Dans ce modèle, l' $\alpha$ -Gal synthétisée pendant le développement de graine serait accumulée dans des corps protéiques alors que ses substrats (RFOs et galactosyl-cyclitols) seraient accumulés dans le cytosol (Muller et Jacks, 1983; Plant et Moore, 1983). Pendant la germination, ces oligosaccharides seraient transportés du cytosol aux corps protéiques qui évolueraient en vacuole dans laquelle ils seraient ensuite hydrolysés (Buckeridge et Dietrich, 1995). Ces composés RFOs sont présents dans les grains de café mûrs (Chabrigillange *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 1999b). Il est également intéressant de constater que les grains des variétés de *C. canephora* et *C. arabica* ont des teneurs en stachyose proches, alors que celles en raffinose de *C. canephora* sont plus faibles que celles de *C. arabica*. Comme le stachyose est dégalactosylé en raffinose sous l'action de l' $\alpha$ -Gal, les teneurs réduites observées dans les grains de *C. canephora* pourraient être une conséquence directe des faibles activités  $\alpha$ -Gal observées chez cette espèce.

L'analyse de la préparation d' $\alpha$ -Gal commerciale (Sigma, réf. G8507) par gel 2-DE révèle la présence de plusieurs protéines qui ont été caractérisées par séquençage N-terminal et interne (Fig. 17). Au moins deux protéines ayant des PMs identiques ( $\approx 40$  kDa) mais des pI légèrement différents (5,5 et 5,7), sont identifiées comme étant des isoformes différentes de l' $\alpha$ -Gal. Nous avons également mis en évidence la présence d'autres protéines (dénommées UP1 et 2, UP: «Unidentified Protein») de plus faible PM (32-35 kDa) et pour lesquelles les séquences N-terminales et internes ne présentent aucune homologie dans les banques de données publiques. En utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre l' $\alpha$ -Gal, nous avons montré que cette enzyme est présente dans les grains matures de *C. arabica* cv. Caturra 2308 qui contiennent également les protéines UP (Fig. 17).

Pour analyser les séquences  $\alpha$ -Gal chez différentes espèces de *Coffea*, deux ADNc pleine longueur, l'un de *C. arabica* cv. Caturra 2308 (nommé CaGAL1) et l'autre du clone de *C. canephora* (♀461 x ♂197) (nommé CcGAL1) ont été isolés. La comparaison de ces séquences avec celles déjà publiées (Zhu et Goldstein, 1994; Ivy et Clements, 2001) révèlent l'existence de quelques modifications au niveau nucléique qui se traduisent par un nombre limité de changements au niveau protéique. Dans tous les cas, les protéines déduites de ces ADNc ont des PMs théoriques (après le clivage N-terminal des pré- et pro-peptides) et des pI très similaires. Seulement 8 acides aminés diffèrent entre les protéines CaGAL1 et CcGAL1 et aucun de ces changements affecte les acides aminés essentiels à l'activité enzymatique  $\alpha$ -Gal (Zhu *et al.*, 1995b; Zhu *et al.*, 1996; Maranville et Zhu, 2000b).

Ces analyses de séquences ne permettent donc pas d'expliquer la présence dans le grain mature des deux isoformes d' $\alpha$ -Gal ayant des pIs différents. Il semble improbable que ces différences proviennent de clivages alternatifs dans l'extrémité N-terminale puisque ces isoformes présentent justement des séquences identiques dans cette région. De même, l'existence des modifications de post-traductionnelles dans la région de C-terminale est exclue puisque que les acides aminés TPQ situés à cette extrémité sont essentiels pour l'activité (Maranville et Zhu, 2000a). Enfin, il semble que ces différences de pIs ne soient pas dues à des glycosylations, par exemple au site putatif de N-glycosylation NIS, puisque l' $\alpha$ -Gal purifiée de grains de café ne se lie pas à la concanavaline A (Zhu et Goldstein, 1995). Ceci suggère donc l'existence d'une famille multigénique, au moins constituée de deux gènes codant ces isoformes comme le montrent les expériences de Southern-blot.

Les analyses d'expression au cours de la maturation des grains de *C. arabica* révèlent une forte accumulation des ARN messagers  $\alpha$ -Gal entre la 22<sup>ème</sup> et la 27<sup>ème</sup> SAF qui se superposent parfaitement avec le pic d'activité enzymatique (Fig. 18). Par contre, aucune expression n'est détectée aux stades jeunes (<22 SAF) ou

dans les grains matures (35 SAF). Ce profil d'expression coïncide aussi avec celui du gène codant pour la  $\beta$ -1,4 mannane synthétase (Salmona *et al.*, 2008) et correspond précisément au stade de durcissement de l'endosperme durant lequel s'opèrent la synthèse des galactomannanes et la diminution du rapport Gal/Man (Redgwell *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent que l' $\alpha$ -Gal contrôle le dépôt des mannanes dans les parois cellulaires en assurant la dégalactolysation des galactomannanes solubles néo-synthétisés.

Les travaux menés par le groupe du Pr M. Buckeridge (USP, Université de São Paulo) sur ces polysaccharides ont récemment permis de purifier une enzyme ayant une fonction  $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase mais qui ne présente aucune homologie avec les  $\alpha$ -Gal du type EC 3.2.1.22 (Silva, 2006). Curieusement, les séquences N-terminales et internes de cette protéine correspondent aux séquences des protéines UP1 et UP2. Une recherche d'homologie de séquence dans la banque de donnée du projet «Genoma café» révèle la présence de nombreux EST codant cette protéine, en particulier dans la banque d'ADNc de l'espèce *C. racemosa*. Nous avons cloné un ADNc pleine longueur codant cette protéine chez *C. arabica* et observé que l'expression du gène correspondant avec la phase de durcissement de l'endosperme aussi bien chez cette espèce que chez *C. racemosa* (résultats non publiés). Par ailleurs, la protéine déduite de cette séquence présente de fortes similitudes (BlastP: E Value  $2e^{-133}$ ) avec de nombreuses protéines végétales en particulier d'*A. thaliana* et d'*O. sativa* dont la fonction est inconnue. Les travaux visant à sur-exprimer cette protéine dans *Pichia pastoris* sont actuellement en cours et devraient permettre de vérifier si cette protéine correspond effectivement à une nouvelle forme de galactosidase végétale.

Afin de vérifier le rôle de l' $\alpha$ -Gal dans le contrôle du dépôt (et donc de l'insolubilité) des mannanes dans la paroi cellulaire, nous avons entrepris de transformer des caféiers avec des constructions utilisant le promoteur 11S pour modifier l'expression (stratégies sens et anti-sens) du gène *CaGAL1* (Marraccini *et al.*, WO 03/032713). Les transformations génétiques ont été réalisées et plusieurs dizaines de plantes ont été régénérées. A ce jour, les résultats de ces expérimentations ne sont pas publiés.

## C-5.2. Les endo- $\beta$ -mannanases du grain de caféier

Les tests enzymatiques ont montré que l'activité mannanase, mesurée par dégradation du substrat insoluble AZCL-galactomannane (Megazyme), croît au cours de la germination *in vitro* des grains de *C. arabica* cv. Caturra 2308 pour atteindre un maxima vers 28 jours après imbibition (JAI). Cette activité décroît ensuite avec le temps de germination (Fig. 19). Par ailleurs, aucune activité n'a été détectée dans les grains mûrs avant la germination ou dans des radicules excisées (données non montrées). La purification de l'endo- $\beta$ -mannanase a donc été réalisée à partir d'un extrait brut de protéines de grain à 28 JAI (Marraccini *et al.*, 2001). Après plusieurs étapes de purification, une fraction enrichie (x7000) a été obtenue puis analysée par gel 2-DE. Cette analyse révèle huit protéines de PMs similaires ( $\approx 43$  kDa) mais avec des pIs variant de 5,5 à 6,0 (Fig. 20).

Le travail présenté ci-dessous concerne le clonage des ADNc d'endo- $\beta$ -mannanases de caféier. Il a été réalisé par Cyril Allard dans le cadre de son stage d'IUP (Université Toulouse III). Les séquençages N-terminaux et internes de ces protéines ont permis le clonage d'un ADNc de 1486 pb dénommé *CaMANB*. La protéine déduite de cette séquence est constituée de 416 résidus d'acides aminés avec un PM de 46,8 kDa et un pI de 7,8. Elle possède un peptide hydrophobe de 30 acides aminés, qui génère après clivage une protéine ayant un PM estimé de 42,6 kDa et un pI de 5,8. Par ailleurs, on retrouve au sein de la protéine *CaMANB*, l'ensemble

des séquences N-terminales et internes obtenues à partir des différentes isoformes purifiées par gel 2-DE. Ces isoformes pourraient s'expliquer par des modifications post-traductionnelles puisque que plusieurs sites putatifs de *N*-glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr) sont présents dans cette protéine comme d'ailleurs dans les autres endo- $\beta$ -mannanases végétales (Nonogaki *et al.*, 2000). Au niveau protéique, la protéine CaMANB présente 70% d'homologies (H) et 81% de similitudes (S) avec la protéine MAN1 de laitue dont l'expression est observée dans l'endosperme après la germination du radicule (Wang *et al.*, 2004). Les analyses phylogéniques effectuées récemment par Yuan *et al.* (2007) montrent que la protéine CaMANB est plus proche de la protéine LeMAN4 de tomate (Bourgault et Bewley, 2002) que des protéines LeMAN1, LeMAN2 et LeMAN3 (Bewley *et al.*, 1997; Nonogaki *et al.*, 2000) (Fig. 21).

En se basant sur la séquence de l'ADNc *LeMAN1* de la tomate, premier ADNc d'endo- $\beta$ -mannanase végétale disponible au moment où nous avons débuté cette étude (Bewley *et al.*, 1997), un deuxième ADNc appelé *CaMANA* a également été cloné. Avec 1574 pb, cet ADNc a une taille proche de *CaMANB* mais ces séquences ne présentent entre-elles que 60% d'identité. La protéine putative *CaMANA* est constituée de 427 acides aminés avec un PM de 48,4 kDa. Elle possède un peptide hydrophobe de 30 acides aminés qui génère après clivage une protéine ayant un PM estimé de 45 kDa. A l'inverse de *CaMANB*, aucune des séquences N-terminales et internes obtenues à partir des différents spots protéiques purifiés par gel 2-DE n'est retrouvée dans la protéine *CaMANA*. Cette protéine est proche des protéines LeMAN1, LeMAN2, LeMAN3 et LeMAN5 (Filichkin *et al.*, 2004) de tomate et présente une homologie est plus faible (H=52%; S= 72%) avec la protéine LeMAN4 (Fig. 22).

Bien que codées par des ADNc différents, les protéines *CaMANA* et *CaMANB* présentent de fortes homologies (H=58%; S= 78%). Elles possèdent les acides aminés Glu-210<sup>6</sup> et Glu-327<sup>6</sup> (Fig. 23) caractérisés comme étant respectivement le site catalytique et le résidu nucléophile de la protéine LeMAN4a, première mannanase végétale dont la structure tridimensionnelle a été réalisée (Bourgault *et al.*, 2005). En revanche, elles diffèrent par la taille principalement dans la région C-terminale, la protéine *CaMANB* étant plus courte de 21 acides aminés que *CaMANA*. En comparant les séquences des ADNc *LeMAN4* dans les cultivars Trust (*LeMAN4a*: enzyme active) et Walter (*LeMAN4i*: enzyme inactive) de tomate, Bourgault et Bewley (2002) ont montré l'importance de la région C-terminale pour le repliement correct de l'enzyme LeMAN4, en particulier de la leucine localisée en position n-1. Cet acide aminé est également conservé dans la région C-terminale des protéines *CaMANB* mais absent dans la protéine *CaMANA* (Fig. 21). Ceci explique peut être pourquoi la protéine *CaMANA* surproduite à partir d'*Escherichia coli* est insoluble et inactive car elle s'accumule sous la forme dénaturée dans des corps protéiques (Marraccini et Rogers, non publié). Cette caractéristique rappelle celle de la protéine LeMAN4 qui n'est extraite du péricarpe de la tomate en condition très saline ce qui révèle sa forte adhésion aux parois cellulaires (Bewley *et al.*, 2000). En revanche, la protéine recombinante *CaMANB* surexprimée à la fois dans *Escherichia coli* et *Yarrowia lipolytica* est soluble et active sur le substrat AZCL-galactomannane (Marraccini *et al.*, Patent WO 01/75084).

Les analyses d'expression réalisées au cours de la germination des grains de *C. arabica* cv. Caturra 2308 montrent des profils d'accumulation des transcrits *CaMANA* et *CaMANB* identiques avec l'absence d'expression dans les premiers stades de germination (<10 JAI), un maxima à 20 JAI et une baisse d'expression

<sup>6</sup>Numérotation des acides aminés sur la base de la protéine *CaMANA*

régulière jusqu'à 35 JAI où les transcrits sont indétectables. Ceci traduit une bonne corrélation entre la détection de ces ARNm et l'augmentation de l'activité enzymatique mannanase observée entre 21 et 28 JAI. Par ailleurs, aucune expression n'est détectée pour les deux gènes au cours de la maturation du grain (entre 7 et 35 SAF), ni dans les feuilles, les fleurs, les racines ou les embryons somatiques. Ces observations sont partiellement en accord avec les résultats des Northern électronique obtenus à partir des données EST du projet «Genoma café» (De Castro et Marraccini, 2006). En effet, parmi les 33 séquences d'EST d'endo- $\beta$ -mannanase identifiées au sein de ce projet, 12 proviennent des banques d'ADNc de feuilles (soit 0,04% des EST), 6 des fruits (0,02%) et 3 des bourgeons floraux (0,01%). Parallèlement, seulement 2 EST d'endo- $\beta$ -mannanase sont présents dans la banque d'ADNc de grain en cours de germination. L'analyse des EST de *C. canephora* montre également la présence de 7 ESTs apparentée aux séquences *CaMANA* et *CaMANB* dans les banques d'ADNc de fruits aux stades de maturation intermédiaire (30 SAF: 0,04%) et tardif (42-46 SAF: 0,04%) (Lin *et al.*, 2005). Quelles que soient les espèces, on observe qu'aucune de ses séquences d'EST n'est strictement identique aux séquences d'ADNc *CaMANA* et *CaMANB*. En particulier, l'absence d'EST identiques à ces séquences au sein de la banque d'ADNc de grain en cours de germination du projet «Genoma café», est inattendue en particulier au regard des niveaux d'expression de ces gènes observés à 20 JAI. Il est probable que la sous-représentation de ces séquences au sein du projet «Genoma café» soit la conséquence d'une mauvaise couverture des stades de germination des grains utilisés pour construire la bibliothèque d'ADNc de grains en germination (De Castro et Marraccini, 2006).

Afin de vérifier la fonction de ces deux endo- $\beta$ -mannanases dans le contrôle de la dégradation des mannanes pariétaux, les ADNc *CaMANA* et *CaMANB* ont été clonés dans des vecteurs de transformation sous le contrôle du promoteur 11S et introduits dans le caféier. Pour les mêmes raisons que celles décrites précédemment (voir C-2.3.), aucune information concernant l'analyse des effets de ces constructions dans les grains des caféiers transformés n'est actuellement disponible ou publiée. Quoiqu'il en soit, cette étude a montré qu'il existe plusieurs types d'endo- $\beta$ -mannanase présentant des profils d'expression différents chez le caféier. Ces résultats sont confirmés les expériences d'hybridation moléculaire montrent que chez *C. arabica* cv. Caturra 2308, le gène *CaMANB* fait partie d'une petite famille de gènes comprenant au moins 2 copies alors que le gène *CaMANA* est probablement unique dans le génome de cette espèce. Par ailleurs, les 33 séquences d'EST mises à jour par le projet «Genoma café» peuvent être regroupées (après clusterization) en 4 contigs indépendants. Si l'on considère que les contigs correspondent à des ADNc provenant de la transcription de gènes différents, l'ensemble de ces résultats suggère la présence d'au moins 6 gènes d'endo- $\beta$ -mannanase chez le caféier *C. arabica*. Cette situation s'apparente à celle observée chez d'autres plantes comme *L. esculentum*, *A. thaliana* et *O. sativa* pour lesquelles il existe respectivement au moins 5, 7 et 9 gènes codant pour différentes isoformes d'endo- $\beta$ -mannanases<sup>7</sup>. Même si ces endo- $\beta$ -mannanases présentent entre-elles de très fortes homologues, elles peuvent remplir différentes fonctions comme suggéré par les profils d'expression spécifiques selon les tissus (Nonogaki *et al.*, 1995; Nonogaki et Morohashi, 1996; Yuan *et al.*, 2007). Ainsi, les gènes *LeMAN1* et *LeMAN3* s'expriment respectivement dans la partie latérale et centrale de l'endosperme des graines après la germination *sensu stricto*, c'est à dire après l'émergence de la radicule (Gong et Bewley, 2007). Tous deux coderaient donc pour des isoenzymes de mobilisation de réserves des mannanes facilitant la croissance de l'embryon, l'expression de *LeMAN3* étant d'ailleurs induite par la présence d'acide gibbéréllique (Bewley *et al.*, 1997;

<sup>7</sup> <http://www.expasy.ch/cgi-bin/nicezyme.pl?3.2.1.78>



Nonogaki *et al.*, 2000). Le gène *LeMAN2*, s'exprime quant à lui au moment de la germination, précisément et exclusivement dans la région micropylaire de l'endosperme afin de permettre l'expansion du radicule (Nonogaki *et al.*, 2000; Belotserkovsky *et al.*, 2007). Plus récemment, l'expression de ce gène, initialement appelé *LeMAN5* (Gong et Bewley, 2007), a été montrée comme étant spécifique des anthères et du grain de pollen (Filichkin *et al.*, 2004). Ainsi, cette endo- $\beta$ -mannanase pourrait être essentielle pour la germination du tube pollinique mais aussi pour sa croissance dans le stigmate en assurant la dégradation des parois cellulaires à la fois du pollen et des tissus gamétophytiques femelle. L'expression du gène *LeMAN4* est quant à elle observée au cours de la maturation du fruit, plus précisément dans la peau et le péricarpe externe où l'activité mannanase est supposée être impliquée dans le ramollissement du fruit (Bewley *et al.*, 2000). En plus de ces gènes, l'analyse des séquences EST de tomate<sup>8</sup> révèle cinq unigènes supplémentaires, qui constituent autant de gènes putatifs d'endo- $\beta$ -mannanases dont l'apparition pourrait être liée aux gain/perte d'intron au cours de l'évolution (Yuan *et al.*, 2007).

L'expression des gènes *CaMANA* et *CaMANB*, observée vers 20 JAI lorsque la taille de la radicule a déjà atteint approximativement 3cm, est similaire à celle du gène *LeMAN1* de tomate. Cependant, il existe d'autres isoformes d'endo- $\beta$ -mannanases interviennent plus précocement au cours de la germination du grain de *C. arabica* cv. Rubi (da Silva *et al.*, 2004). Ainsi durant les premiers jours l'imbibition, l'activité endo- $\beta$ -mannanase mesurée dans la région micropylaire de l'endosperme est détectée dès 5 JAI augmente pour atteindre un maximum vers 8-10 JAI et décroît ensuite régulièrement jusqu'à 14 JAI (da Silva *et al.*, 2005). Cette augmentation s'accompagne également d'une activité cellulosique qui fragilise les parois cellulaires dans cette même région. Cette activité endo- $\beta$ -mannanase micropylaire précède celle détectée ensuite dans le reste de l'endosperme. Par électrofocalisation en gel d'agarose (IEF), au moins 3 isoenzymes d'endo- $\beta$ -mannanase (pI 4,5, 6,5 et 7,0) sont détectées dans la région micropylaire dont deux sont absentes dans les grains ayant germé en présence d'acide abscissique (ABA). Une isoforme supplémentaire de pI 5.5 est aussi détectée pour le reste de l'endosperme. Un ADNc partiel de mannanase dont la séquence est strictement identique à l'ADNc *CaMANA* a été cloné à partir des microdissections la région micropylaire de l'endosperme à 5 JAI (da Silva, 2002), suggérant l'intervention de cette mannanase lors des stades initiaux de la germination comme proposé dans le cas de la protéine *LeMAN2* (Nonogaki *et al.*, 2000). Cependant, comme aucune étude d'expression des gènes codant ces isoenzymes n'a été réalisée, il est impossible de savoir si celles-ci sont exprimées à partir de gènes néo-transcrits dans les phases précoces de la germination ou bien traduites à partir d'ARNm pré-accumulés dans les derniers stades de maturation du grain, comme le suggère par la présence d'ESTs dans les banques de grain en cours de maturation.

Récemment, Schröder *et al.* (2004, 2006) ont montré que l'endo- $\beta$ -mannanase *LeMan4* possède en plus de son activité hydrolase, une activité transglycosylase capable de transférer des polysaccharides mannosés (comme le galactoglucomannane) sur des oligosaccharides mannosés (comme le galactomannane pentasaccharidique = G2M5). Cette découverte a conduit les auteurs à proposer de renommer cette enzyme en mannanase transglycosylase/hydrolase en accord avec la nomenclature établie pour les enzymes végétales de type xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (Fry *et al.*, 1992). Elle ouvre aussi de nouvelles voies pour

<sup>8</sup> <http://www.sgn.cornell.edu/>

explorer le rôle réel joué par ces enzymes dans la modification des parois durant les phases d'expansion cellulaire, de germination des graines et de maturation des fruits.

A ce jour, depuis notre travail et ceux publiés par da Silva *et al.* (2004, 2005), aucune autre étude n'est venue compléter l'analyse moléculaire des endo- $\beta$ -mannanases du caféier. A la lumière des études menées chez la tomate et des avancées réalisées au niveau moléculaire chez le caféier, il serait pertinent de mener les recherches nécessaires pour identifier et caractériser les gènes *MAN* de caféier.

## C-6. Etude du métabolisme du saccharose: un autre précurseur essentiel des arômes

Comme décrit précédemment, la dégradation du saccharose pendant la torréfaction forme des anhydres de sucres et d'autres composés comme le glyoxal qui réagissent ensuite avec des acides aminés libres ou provenant du clivage thermique des protéines pour former des acides aliphatiques, des composés de type furfural essentiels à la saveur et aux arômes du café à la tasse (De Maria *et al.*, 1994). Ainsi, la préférence pour des cafés Arabica semble être reliée en grande partie aux différences de contenu en saccharose dans les grains mûrs (Casal *et al.*, 2000), celui-ci variant de 5.1% à 9.4% du poids sec (PS) des grains chez cette espèce, et de 4% à 7% du PS pour les grains de l'espèce *C. canephora* (Ky *et al.*, 2001; Campa *et al.*, 2004).

En dépit de l'importance du saccharose comme précurseur de la qualité du café, on ne connaissait rien au sujet de sa distribution dans les tissus ni des principales enzymes de son métabolisme, telles que les invertases (EC 3.2.1.26,  $\beta$ -fructosidase,  $\beta$ -fructofurannosidase), la saccharose phosphate synthétase (SPS: EC 2.4.1.14, UDP-glucose: D-fructose 6 phosphate 2-glucosyl-transférase) et la saccharose synthétase (SUS: EC 2.4.1.13, UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyl-transférase). Les invertases, qui catalysent l'hydrolyse irréversible du saccharose en glucose et fructose, sont impliquées dans plusieurs fonctions importantes comme le contrôle du développement des plantes et les réponses à de nombreux stimulus environnementaux (Roitsch et González, 2004). En revanche, la SPS fonctionne principalement dans le sens de la synthèse de sucrose (UDP-glucose + fructose-P  $\rightarrow$  sucrose-P + UDP) tandis que la SUS catalyse une réaction réversible (UDP-glucose + fructose  $\leftrightarrow$  sucrose + UDP). En contrôlant la synthèse et la dégradation du saccharose nécessaire pour produire l'énergie mais aussi en assurant les grandes fonctions métaboliques comme la synthèse d'amidon dans des organes de stockage ou la biosynthèse des parois cellulaires, ces deux enzymes jouent un rôle important dans le développement des plantes (Sturm et Tang, 1999, pour revue).

Nos études ont donc consisté à réaliser une analyse détaillée du métabolisme des sucres au cours de la maturation du grain de *C. arabica*, à caractériser les enzymes essentielles de ce métabolisme, tant au niveau biochimique que moléculaire et à essayer de comprendre le rôle joué par certains facteurs environnementaux (comme l'ombrage) sur ce métabolisme. Ce travail est le fruit d'une collaboration scientifique étroite initiée en 2002 entre les équipes du Cirad (UMR-PIA puis DAP), de l'institut Agronomique du Paraná (IAPAR), de l'Université de Campinas (UNICAMP) et de l'Embrapa. La partie biochimie de ce travail a fait l'objet de la thèse de doctorat de Clara Geromel dont j'ai assuré le co-encadrement avec le Pr P. Mazzafera. La partie moléculaire a quant à elle été réalisée au IAPAR par Lucia Pires Ferreira, ingénieure de recherche dont j'ai assuré l'encadrement pendant 4 ans.

### C-6.1. Evolution des sucres au cours de la maturation du grain de caféier

Les mesures des teneurs en sucres réducteurs et en saccharose effectuées au cours de la maturation du grain de *C. arabica* cv. IAPAR59 ont été comparées avec les courbes d'évolution des différents tissus du fruit (Geromel *et al.*, 2006). Les résultats montrent que les rapports hexoses (H)/sucrose (S) élevés coïncident avec les phases d'expansion tissulaire à la fois du péricarpe (entre 60-89 JAF) et de l'endosperme (entre 118-147 JAF). La disparition d'amidon constatée dans le péricarpe peut également expliquer le pic des sucres réducteurs détectés dans ce tissu à la 89 JAF. Dans le péricarpe, la diminution du rapport H/S s'accompagne de la disparition progressive de ce tissu et caractérise l'accroissement de l'endosperme. Dans ce tissu, la diminution du rapport H/S coïncide avec la fin de son accroissement et le début de la phase de stockage (Rogers *et al.*, 1999b). Ces observations coïncident avec celles obtenues chez les graines de plusieurs plantes supérieures, chez lesquelles il est montré qu'un rapport H/S élevé caractérise la phase de pré-stockage et de divisions cellulaires intensives (Goldberg *et al.*, 1989). L'inversion du rapport H/S lors de la phase de maturation (stockage) s'accompagne de la différenciation de cellules et de leur élongation (Fig. 24). Les derniers stades de maturation sont caractérisés par l'augmentation du saccharose dans le péricarpe et l'endosperme et des sucres réducteurs dans le péricarpe (ceux-ci étant pratiquement indétectables dans l'endosperme). On peut noter que ces variations de teneurs en sucres sont particulièrement importantes dans le dernier mois précédant la récolte, ce qui rappelle aux producteurs, s'il en était encore besoin, toute l'importance de récolter les grains au stade mature pour obtenir un grain de café de qualité.

A quelques différences près, ces profils d'évolution des sucres dans fruits de *C. arabica* cv. IAPAR59 ont été confirmés sur deux ans de récolte (2002-2003: Geromel *et al.*, 2006 et 2003-2004: Geromel *et al.*, 2008b). Par contre, la teneur en saccharose des grains matures des plantes cultivées en plein soleil est significativement plus élevée ( $\approx 8.5\%$  du PS) que celle mesurée dans les grains des plantes cultivées sous ombrage artificiel ( $\approx 7.9\%$  du PS). Ces résultats sont conformes à ceux observés par Vaast *et al.* (2006) qui montrent une plus faible teneur en saccharose avec l'ombrage dans les grains du cultivar Costa Rica 95 (Catimor) de *C. arabica*. Par contre, ils diffèrent des résultats observés pour le cultivar Catuai pour lequel un contenu plus élevé en saccharose est observé dans les grains cultivés en ombrage par rapport à ceux provenant de plantes en plein soleil (Guyot *et al.*, 1996). Ces différences pourraient s'expliquer par des réponses différentes des cultivars aux conditions environnementales. Ainsi, on remarque que les cultivars IAPAR59 (nos études) et Costa Rica 95 contiennent tous les deux des introgressions récentes de *C. canephora* provenant de l'hybride de Timor tandis que le Catuai correspond à un cultivar non-introgressé de *C. arabica* (Silveira *et al.*, 2003). Afin de savoir si la réduction du contenu en saccharose sous ombrage observée dans les cultivars introgressés (Sarchimor et Catimor) est héritée de *C. canephora*, il serait pertinent analyser le métabolisme des sucres et les effets de l'ombrage au sein de cette espèce. Ces différences pourraient provenir également d'un effet «terroir» (exposition, altitude de pente), des conditions méso-climatiques (température de l'air et hygrométrie) (Avelino *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005) mais aussi du traitement post-récolte (Knopp *et al.*, 2006). Dans leur ensemble, ces travaux montrent toute la difficulté de comparer les données biochimiques de grains récoltés à partir de plantes cultivées dans conditions climatiques différentes.

En revanche, nous avons observé l'existence de différences importantes concernant le métabolisme des sucres entre *C. arabica* cv. IAPAR59 et *C. racemosa* (Fig. 25). Alors que les profils d'accumulation en sucres

réducteurs et en saccharose semblent similaires au cours de la maturation du péricarpe et du péricarpe de ces deux espèces, les teneurs en saccharose dans l'endosperme de *C. racemosa* sont élevées tout au long de la maturation d'endosperme, atteignant une valeur maximum (9.0% du PS) à 40 DAF et diminuant jusqu'à 6.8% du PS au stade mature (Campa *et al.*, 2004). Ce niveau élevé en saccharose peut s'expliquer par une demande importante en énergie pour le développement rapide du fruit (et donc du grain) chez *C. racemosa*. En effet, celui-ci s'effectue en un peu plus de 2 mois avec une phase de croissance de l'endosperme qui s'observe entre 30 et 40 DAF. Par analogie avec les phases de maturation de *C. arabica*, on peut supposer que les synthèses de composés de réserve (polysaccharides complexes, protéines...) doivent avoir lieu durant cette période, comme suggéré par les résultats d'expression du gène UP (voir C-5.1.).

## C-6.2. La saccharose synthétase

Pour déterminer quelles sont les principales enzymes impliquées dans le métabolisme du saccharose du grain de caféier, les activités enzymatiques invertase acide (AI: EC 3.2.1.26), saccharose phosphate synthétase (SPS: EC 2.4.1.14), et saccharose synthétase (SUS: EC 2.4.1.13) ont été mesurées au cours de la maturation des grains de *C. arabica* cv. IAPAR59 dans les extraits protéiques préparés séparément à partir du péricarpe, de l'endosperme et du péricarpe (Geromel *et al.*, 2006). Ces analyses montrent notamment de faibles activités AI dans l'endosperme et ceci quelque soit le stade de développement. L'activité SPS présente un pic aussi bien dans le péricarpe que dans l'endosperme vers 147 DAF, c'est à dire au moment de la disparition du péricarpe et du développement de l'endosperme, puis décroît jusqu'au stade mature. Ces profils d'activité SPS sont en accord avec les observations de Salmona *et al.* (2008) qui montrent une décroissance de l'expression du gène SPS, mais aussi de celle du gène de la saccharose phosphatase, au cours de la maturation. Par comparaison avec ces deux premières enzymes, les activités enzymatiques SUS sont les plus importantes et augmentent régulièrement avec le développement grain pour être maximales au stade mature dans le péricarpe et l'endosperme, mais également dans le péricarpe en phase de résorption. Par comparaison avec les profils d'accumulation des sucres, les pics activités SUS se superposent parfaitement avec l'augmentation du saccharose observée en fin de maturation.

En utilisant les données du projet EST «Genoma café», deux ADNc pleine longueur (dénommés *CaSUS1* et *CaSUS2*) ont été clonés. L'analyse de leur séquence montre qu'ils codent pour des isoenzymes SUS qui sont phylogénétiquement distinctes puisque les protéines *CaSUS1* et *CaSUS2* ne présentent entre elles que 68% de l'identité et 82% de similitude. La protéine *CaSUS1* est apparentée au groupe «Dicot SUS1» de SUS (Baud *et al.*, 2004) regroupant les isoformes rencontrées généralement dans les organes de stockage comme les formes SUS3, SUS4 de pomme de terre (Fu et Park, 1995). En revanche, l'isoforme *CaSUS2* est apparentée au groupe «Dicot SUS2» qui comprend notamment la protéine CitSUS2 du citronnier (Komatsu *et al.*, 2002) et la SUS de betterave sucrière (Hesse et Willmitzer, 1996). Cette répartition des isoformes de SUS en groupes phylogénétiques distincts est renforcée par la comparaison de la structure des gènes correspondants. Ainsi le gène *CaSUS2* diffère clairement du gène *CcSUS1* isolé à partir de la banque BAC de *C. canephora* (Leroy *et al.*, 2005), par la présence de deux introns supplémentaires dans les exons 5 et 11 de *CcSUS1*. Ces données suggèrent l'intervention de ses isoformes dans des fonctions physiologiques différentes au cours du développement du fruit du caféier. Les profils d'expression de ces gènes confortent cette hypothèse. Ainsi, les

transcrits *CaSUS1* sont détectés principalement durant les phases précoces du développement du péricarpe et de l'endosperme, et pendant les phases d'expansion du péricarpe. En revanche, les transcrits *CaSUS2* sont observés uniquement durant les dernières semaines du développement du péricarpe, de l'endosperme et du péricarpe (Fig. 26). Cette expression différentielle des gènes *CaSUS1* et *CaSUS2* a d'ailleurs été confirmée récemment chez *C. arabica* (Geromel *et al.*, 2008b; Salmona *et al.*, 2008) mais également au cours du développement du fruit de *C. racemosa* (Geromel *et al.*, 2008a).

En dépit de la forte expression du gène *CaSUS2* en fin maturation, de manière surprenante on retrouve très peu séquences de ce gène dans les projets de séquençage d'EST de caféier. Ainsi, 1 EST et 18 ESTs de ce gène sont présents respectivement chez *C. canephora* (Lin *et al.*, 2005) et *C. arabica* (De Castro et Marraccini, 2006). Parallèlement, on retrouve 212 ESTs du gène *CaSUS1* chez *C. arabica* et 61 séquences chez *C. canephora*. La sous-représentation des ESTs *CaSUS2* dans ces projets pourrait s'expliquer par une difficulté d'extraire les ARNm au stade final de maturation ou plus simplement par une mauvaise couverture des stades phénologiques utilisés pour construire les banques d'ADNc. Préalablement au clonage de l'ADNc *CaSUS1*, une séquence partielle *SUS1* (AJ575256) a été clonée à l'aide des amorces dégénérées déduites des régions conservées des séquences *SUS* végétales. L'alignement de cette séquence avec celle de l'ADNc *CaSUS1* montre huit différences qui affectent toutes la troisième base des codons sans modifier la séquence protéique. Une analyse approfondie de recherche de SNP dans le gène *SUS1* de 15 espèces de *Coffea*, a confirmé que la plupart des SNP (70%) des exons sont synonymes ce qui confirme l'importance de maintenir l'intégrité de cette protéine (Bouchet, 2005). Comme les deux séquences *SUS1* ont été amplifiées à partir du même cultivar de *C. arabica* (IAPAR59), il est probable qu'elles correspondent à différents allèles du gène *CaSUS1*, l'une (ADNc *CaSUS1* pleine longueur) provenant de *C. eugenoides* et l'autre (ADNc partiel *CaSUS1*) de *C. canephora* (Marraccini et Pot, non publié).

L'utilisation d'anticorps contre l'isoforme principale de *SUS* des téguments de pois (Ps*SUS1*, C Rochat, communication personnelle) révèle une protéine *SUS* dans les extraits protéiques de l'endosperme à 118 et 147 JAF (Fig. 26), en même temps que les ARNm *CaSUS1*. Par contre aucune activité *SUS* n'a été détectée à cette période. Cette absence de l'activité pourrait s'expliquer par des modifications post-traductionnelles ou par la nécessité de la présence de cofacteurs pour activer la *SUS* (Winter et Huber, 2000; Röhrig *et al.*, 2004). Par contre, la superposition parfaite entre l'activité enzymatique *SUS* et les ARNm du gène *CaSUS2* montre que cette isoforme contrôle de la synthèse (fonction «source») du saccharose observé en fin de maturation des grains de *C. arabica*. A l'inverse, l'expression du gène *CaSUS1* s'observe principalement durant les phases de croissance intensives, comme dans l'endosperme de grains de plantes cultivées sous ombrage (Geromel *et al.*, 2008b), suggérant la participation de cette isoforme dans l'hydrolyse (fonction «puits») du saccharose.

Sur la base de ses résultats, et compte tenu des différences de teneur en saccharose observées dans les grains verts de *C. arabica* et *C. canephora*, une analyse comparative du métabolisme des sucres et de l'expression des gènes *SUS* au sein de ces deux espèces pourrait être envisagée. Elle est toutefois compliquée par le fait que ces espèces ont des caractéristiques agronomiques différentes qui empêchent de disposer sur un même lieu d'expérimentation de plantes dans des conditions optimales de développement pour chacune d'elles.

## D. Conclusions et perspectives

Les études présentées ci-dessus s'inscrivent dans l'acquisition de connaissances moléculaires et biochimiques des principales voies du métabolisme du grain de caféier. Au regard des résultats obtenus, certaines études nécessiteraient d'être approfondies, comme par exemple celle concernant le déterminisme génétique des protéines de réserves. D'autres ont permis d'initier des analyses de diversité génétique des espèces de *Coffea* comme c'est le cas avec les séquences des gènes codant pour les enzymes du métabolisme du saccharose (Bouchet, 2005; Pot *et al.*, 2006) et plus récemment avec la voie biosynthèse des diterpènes (cafestol et kawheol) (Leroy *et al.*, 2007). A terme, on espère pouvoir positionner ces gènes sur les cartes génétiques de *Coffea*, comme celle de *C. canephora* en cours d'élaboration au Cirad (Dufour *et al.*, 2001), valider leur pertinence avec le positionnement de QTLs (Leroy *et al.*, 2006) et utiliser ainsi ces informations dans les programmes d'amélioration visant par exemple à améliorer la qualité organoleptique du café.

Les travaux d'analyse du transcriptome que nous avons réalisé sur *C. arabica* révèlent la complexité des profils d'expression génique qui s'expliquent essentiellement par les changements tissulaires s'opérant au cours du développement des fruits de caféier. Ces études sont rendues difficiles de part la longueur de la maturation des fruits qui ne facilite pas la réalisation d'analyses transcriptomiques détaillées. Par contre, ces analyses seraient facilitées par l'étude des grains d'espèces de *Coffea* à court cycle de développement comme le montrent nos premiers résultats concernant l'analyse des sucres (Geromel *et al.*, 2008a) et de l' $\alpha$ -galactosidase chez *C. racemosa* (Silva *et al.*, résultats non publiés). Par ailleurs, le séquençage d'EST de l'espèce *C. eugenoides* serait particulièrement pertinent puisque cette espèce est l'un des parents de *C. arabica*. Compte tenu des séquences EST déjà disponibles chez *C. canephora* et *C. arabica*, ces informations pourraient permettre de savoir quelles sont les formes alléliques des gènes qui s'expriment chez *C. arabica*. Ces analyses pourraient être réalisées en confectionnant des microarrays avec des oligonucléotides spécifiques de chacun des parents de cette espèce par exemple pour analyser le transcriptome des fruits de caféier en cours de maturation.

Enfin, ces travaux sont indissociables des études visant à analyser de la diversité génétique présente au sein des collections de *Coffea*, que ce soit d'*arabica* ou de *canephora* (Cubry *et al.*, 2008). En effet, même si cette diversité est estimée comme étant réduite au sein des plantes cultivées de *C. arabica* (Steiger *et al.*, 2002), le criblage des collections de plantes sauvages de cette espèce a permis l'isolement de mutants naturellement déficients en caféine (Silvarolla *et al.*, 2004). Concernant la recherche de gènes liés à la «qualité», l'utilisation des gènes présentés dans ce travail pourrait faciliter le criblage moléculaire des plantes disponibles dans ces collections.

## Quels bilans sur ces travaux?

L'expérience passée à travailler sur la physiologie moléculaire du caféier dans différentes structures de recherches me permet d'avoir un regard critique sur la situation de la recherche concernant cette plante. Compte tenu de l'importance économique du caféier pour les industriels de la transformation, on comprend la nécessité de certaines compagnies d'assurer une position dominante dans les biotechnologies du caféier. Celle-ci passe évidemment par la constitution d'un portefeuille de brevets qui protège une trousse à outils génomiques dont l'utilisation est toutefois soumise à l'appréciation des lois du marché comme par exemple l'opinion des consommateurs vis-à-vis des organismes génétiquement modifiés. Compte tenu des réactions parfois violentes vis-à-vis de certains travaux présentés dans ce mémoire<sup>9</sup> <sup>10</sup>, on comprend qu'il soit difficile de publier les résultats concernant par exemple les tests de fonction des gènes dans les caféiers transgéniques. Suite aux brevets qui protègent les travaux détaillés dans ce mémoire, plusieurs autres demandes de protection portant sur des gènes exprimés spécifiquement dans les fruits de caféiers ont été déposées. C'est le cas des séquences codant pour les oléosines (Simkin *et al.*, 2007), les déhydrines (Tanksley *et al.*, 2007), plusieurs classes de protéases (McCarthy *et al.*, 2004), les enzymes de la voie des acides chlorogéniques (Lepelley *et al.*, 2007a) et des flavonoïdes (Lepelley *et al.*, 2007b,c) et même celles du métabolisme du saccharose (Privat *et al.*, 2007a,b). Dans ce contexte très compétitif, et malgré les recommandations de l'ANR qui préconise l'établissement de collaborations avec le secteur privé dans le domaine de la recherche sur le caféier, on comprend pourquoi il est très difficile, voir impossible, de présenter de tels projets, en particulier lorsque ceux-ci portent *in fine* sur un enjeu stratégique comme la «qualité».

Cette restriction, qui s'observe également au niveau européen (le caféier, comme d'autres plantes, n'étant plus une culture prioritaire dans le 7<sup>ème</sup> PCRD), oblige à des partenariats solides avec d'autres institutions de recherche pour maintenir nos activités de recherche. C'est le cas au Brésil, par exemple avec le IAPAR et l'Embrapa, où l'importance de la caféiculture dans l'agriculture permet de bénéficier d'appuis financiers de nombreux organismes (CNPq, Consortium R&D Café, FINEP...). Si ces ressources assurent la conduite de ces projets localement (au Brésil), il n'en est pas de même au niveau national (en France), où le Cirad et l'IRD, institutions héritières respectivement de l'IRCC et de l'ORSTOM qui étaient reconnus dans le domaine de la recherche sur le caféier il y a quelques décennies, peinent aujourd'hui à maintenir leurs activités sur cette plante. Cette fragilité est accentuée par le fait que ces projets dépendent étroitement des programmes d'amélioration et des accès aux collections presque exclusivement disponibles dans les pays producteurs. En l'absence de moyens suffisants pour maintenir la recherche sur le caféier au Cirad comme à l'IRD, et en dépit des partenariats développés depuis longtemps par ces institutions, il est à craindre que les activités sur cette plante, comme sur d'autres d'ailleurs, disparaissent à très court terme.

<sup>9</sup> [http://www.terraviva.com/reports/Greenpeace\\_And\\_Nestle\\_Clash\\_Over\\_GM\\_Coffee.htm](http://www.terraviva.com/reports/Greenpeace_And_Nestle_Clash_Over_GM_Coffee.htm)

<sup>10</sup> <http://archive.greenpeace.org/geneng/reports/gmo/pulpfiction.pdf>

## E- Projet de recherche

### Etude des mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans la tolérance à la sécheresse chez le caféier

#### E.1. Situation du sujet

Les changements climatiques observés au niveau planétaire suggèrent que les périodes de sécheresse vont devenir plus fréquentes dans plusieurs régions du globe<sup>11</sup>. Ces modifications pourraient modifier drastiquement les zones de production de café<sup>12</sup>, et fragiliser encore plus la production déjà très affectée ces dernières années par la chute des cours internationaux. Déjà en 2006, le manque d'eau a affecté la production de café dans plusieurs états du Brésil avec des estimations de pertes de production d'environ 15% dans le Minas Gerais (-2.2 M sacs), 20% dans l'Espirito Santo (-1.6 M sacs) et allant jusqu'à 50% dans l'état de Bahia (-0.9 M sacs)<sup>13</sup>. Ainsi, à court terme, des analyses prévoient la production de café ne devrait pas être suffisante pour suffire à la demande mondiale<sup>14</sup>. Dans ce contexte, il devient prioritaire de développer de nouvelles variétés de caféier plus tolérantes à la sécheresse.

Cette tolérance s'observe à l'état naturel chez certains caféiers, principalement au sein de l'espèce *C. canephora* comme chez les groupes génétiques Guinéens et Congolais (sous-groupe SG1) (Montagnon et Leroy, 1993). Ces derniers seraient justement à l'origine de certains des clones Conilon largement répandus au Brésil (Montagnon, 2000). Ainsi, l'Incaper (Vitoria-ES) a développé et recommandé aux producteurs une variété de Conilon appelée «Robustão Capixaba» (EMCAPA 8141), composée de 10 clones élites, c'est à dire présentant à la fois une forte productivité et une bonne tolérance à la sécheresse (Ferrão *et al.*, 1999, 2000). Certains des clones de cette variété ont d'ailleurs déjà fait l'objet de plusieurs études physiologiques et biochimiques (Lima *et al.*, 2002; DaMatta *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2004, Pinheiro *et al.*, 2005, Praxedes *et al.*, 2006). Ces travaux ont montré qu'un meilleur développement des racines, une plus grande protection vis-à-vis du stress oxydatif et le maintien de la synthèse de saccharose dans les feuilles seraient à l'origine de cette tolérance.

Chez *C. arabica*, autre espèce importante pour la caféiculture, il existe également des cultivars qui présentent une tolérance à la sécheresse. Même si cette tolérance est moins marquée que chez *C. canephora*, on pourra toutefois inclure dans notre étude plusieurs cultivars de *C. arabica*, comme ceux cultivés au champ en conditions contrôlées de stress hydrique (dispositif disponible à l'Embrapa-Cerrados, Planaltina, DF). Ainsi, les études de physiologie déjà disponibles sur les deux espèces commerciales de *Coffea* constituent une base essentielle pour initier l'analyse du déterminisme moléculaire de cette tolérance.

#### E.2. Projet de recherche

Le projet de recherche consiste à comprendre le déterminisme moléculaire de la tolérance à la sécheresse chez le caféier par la recherche de gènes candidats (GC) dont l'expression est modifiée quantitativement (c'est à dire induite ou réprimée) chez les clones tolérants par comparaison aux clones sensibles. A terme, ce projet

<sup>11</sup> <http://www.effet-de-serre.gouv.fr/fr/etudes/SPM2007gr1.doc>

<sup>12</sup> <http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=8886>

<sup>13</sup> <http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=4792>

<sup>14</sup> <http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=3317>



devrait fournir aux sélectionneurs des marqueurs pertinents et fiables pour orienter les programmes d'amélioration visant à introduire les GC des clones tolérants de *C. canephora* dans *C. arabica* par exemple.

Cette recherche de GC utilisera les données EST générées par le projet brésilien «Genoma café» (Vieira *et al.*, 2006). Ce projet, cofinancé par le Consortium brésilien de recherche et développement du café<sup>15</sup>, l'Embrapa<sup>16</sup> et l'Unicamp<sup>17</sup> de 2002 à 2005, a permis le séquençage de 200.000 séquences à partir de 37 bibliothèques d'ADNc. Ces dernières ont été confectionnées en utilisant plusieurs tissus (feuilles, fruits, racines, cultures *in vitro*...) de caféiers d'espèces différentes (*C. arabica*, *C. canephora* et *C. racemosa*). Trois d'entre elles proviennent précisément de feuilles (SH1) ou de plantules entières (SH2 et SH3) du clone 14 de *C. canephora* considéré comme l'un des plus tolérants à la sécheresse (DaMatta *et al.*, 2000).

Après «clusterization» (c'est à dire alignement et assemblage des séquences ESTs pour reconstituer des séquences pleine longueur), environ 33.000 «Unigènes» ont été formés. Par comparaison avec *A. thaliana*, plante chez laquelle on estime le nombre de gènes entre 25.498 (AGI, 2000) et 29.084<sup>18</sup>, et compte tenu de la diversité des banques d'ADNc du projet «Genoma café», on estime que ces «Unigènes» recouvrent la quasi totalité des gènes du caféier. Parmi ceux-ci, une première étude *in silico* a montré que l'on retrouve 355 gènes caractérisés chez d'autres plantes comme étant impliqués dans les réponses aux stress abiotiques (Vinecky *et al.*, 2005).

Les séquences EST du projet «Genoma café» ne sont pas actuellement accessibles publiquement dans les banques de données GenBank et EMBL. Toutefois, les accords de collaboration scientifique établis par le Cirad avec le IAPAR<sup>19</sup> et l'Embrapa, permettent aux chercheurs du Cirad en poste dans ces institutions un accès à ces informations.

### E.2. 1. Recherche de gènes candidats (GC)

Dans un premier temps, le présent projet de recherche vise à identifier des GC impliqués dans la tolérance à la sécheresse chez le caféier par des études du transcriptome. Pour cela, on utilisera un programme de «Northern électronique» développé par le laboratoire de bioinformatique du Cenargen<sup>20</sup>, pour identifier les EST dont le pourcentage de représentativité dans les banques d'ADNc varie en fonction du stress hydrique. En particulier, on comparera les banques de feuilles (LV4-9) et de racines (RT3) de *C. arabica* L. cv. Catuai (naturellement sensible au stress hydrique) avec celles du clone 14 de *C. canephora*. Bien entendu, on essayera de caractériser les contigs («cluster») ainsi identifiés, en recherchant les séquences qui leur sont homologues dans les banques de données GenBank et EMBL.

Une seconde étape consistera à valider l'approche *in silico* («Northern électronique») en vérifiant que ces GC présentent bien une expression différentielle en fonction du stress hydrique. Si le nombre de GC est limité (<20), leur expression sera testée par la technique de «Northern-blot», en utilisant comme sonde l'un des ESTs ayant conduit à former les contigs GC. Les hybridations seront réalisées avec les ARN totaux extraits de feuilles et de racines des clones de *C. canephora* tolérants et susceptibles à la sécheresse, cultivés (ou non) en condition de stress hydrique. Si les GC s'expriment faiblement, on utilisera la technique PCR quantitative (Q-PCR), plus sensible et moins consommatrice en ARN que l'approche «Northern-blot».

<sup>15</sup> [http://www22.sede.embrapa.br/cafe/consorcio/index\\_2.htm](http://www22.sede.embrapa.br/cafe/consorcio/index_2.htm)

<sup>16</sup> Entreprise Brésilienne de Recherche Agropastorale, <http://www.cenargen.embrapa.br/biotec/genomacafe/>

<sup>17</sup> Université de Campinas, <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>

<sup>18</sup> <http://www.tigr.org>

<sup>19</sup> Institut agronomique du Paraná, <http://www.iapar.br/>

<sup>20</sup> <http://www.biofoco.org>

Parallèlement à l'étude des GC identifiés au sein du projet «Génome café», on testera également l'expression de gènes déjà décrits chez les plantes comme participant dans la réponse au stress hydrique. Par exemple, on analysera l'expression des gènes codant pour les déhydrines (Hinniger *et al.*, 2006), les aquaporines (Maurel and Chrispeels, 2001), ou contrôlant la distribution, la densité et la régulation de l'ouverture des stomates (Gray, 2005) et le métabolisme du saccharose (Geromel *et al.*, 2006) essentiel dans la synthèse d'osmoprotectants comme le mannitol (Bohnert *et al.*, 1995) et le galactinol (Pattanagul and Madore, 1999).

Enfin, on entreprendra également une approche dite «globale» qui consistera à rechercher les gènes qui présentent une expression différentielle en fonction du stress hydrique à l'aide de filtres de type «macro-array». Pour cela, on criblera les membranes (3x10.000 clones) sur lesquelles auront été déposés les «Unigènes», avec des sondes d'ADNc produites par transcription inverse (RT) des ARN totaux extraits des clones de *C. canephora* tolérants ou sensibles à la sécheresse. On criblera également ces membranes avec des sondes d'ADNc produites à partir des ARN totaux de cultivars de *C. arabica* soumis à différentes conditions de stress hydrique. En comparant les profils d'expression obtenus après le criblage des membranes par les sondes de *C. canephora* (tolérant *versus* sensibles) et de *C. arabica* (stressé *versus* non stressé), on pourra ainsi valider les GC préalablement identifiés par l'approche *in silico* et différencier ceux dont l'expression est modifiée par la sécheresse (réponse au stress) de ceux dont l'expression serait spécifique des clones tolérants.

### E.2.2. Analyse du polymorphisme nucléotidique des GC

Une étude visant à identifier les polymorphismes présents au sein des GC sera également initiée. Elle aura pour objectifs de tester les relations existantes entre la diversité nucléotidique des GC identifiés et la variabilité naturelle pour la tolérance à la sécheresse existant principalement chez l'espèce *C. canephora*. Cette étape constitue un préalable essentiel à l'identification d'outils de sélection pour l'amélioration de ce caractère chez le caféier.

Pour cela, on utilisera les données du projet «Genoma café» (Vieira *et al.*, 2006), et les séquences nucléiques des ESTs de *C. canephora* disponibles dans les banques de données (Lin *et al.*, 2005; Poncet *et al.*, 2006), pour rechercher les polymorphismes de séquences nucléotidiques (SNP, «Single Nucleotidic Polymorphism») au sein des séquences GC. Cette étude sera effectuée préférentiellement sur les GC les plus pertinents, c'est à dire ceux dont les profils d'expression varient significativement entre les clones tolérants et sensibles soumis à différentes conditions de stress hydrique. Dans le cas où de tels SNP seraient identifiés, une recherche de marqueurs moléculaires qui leur seraient associés sera entreprise.

### E.2.3. Validation de gènes candidats

La transformation génétique du caféier (*C. canephora* et *C. arabica*), que ce soit par *Agrobacterium tumefaciens* (Leroy *et al.*, 2000) ou par bombardement (Ribas *et al.*, 2005) est relativement efficace mais ne permet pas une analyse fonctionnelle rapide du gène dans les plantes transformées. Pour cette raison, on entreprendra l'étude fonctionnelle des GC les plus pertinents par transgénèse sur plantes modèles (*A. thaliana*, tabac ou tomate). On pourra aussi tester la fonction de ces GC dans les racines de caféier en utilisant la technique de transformation par *A. rhizogenes* (Alpizar *et al.*, 2006). A terme, ces différentes approches pourront permettre de proposer une stratégie de transformation génétique du caféier pour conférer une meilleure tolérance à la sécheresse.

#### E.2.4. Construction d'une carte génétique de *Coffea* pour le caractère de tolérance à la sécheresse

Les résultats obtenus au Cirad pour la construction d'une carte génétique de *C. canephora*, l'identification de QTLs (projet INCO IQAR) et le déséquilibre de liaison devraient faciliter la construction d'une carte génétique saturée de *C. canephora* var. Conilon. Cette carte sera construite à partir d'une population spécifique (croisement diallèle) disponible à l'Incaper et pour laquelle on observe une variabilité importante pour la tolérance au stress hydrique dans la descendance. Cette étude sera facilitée par l'utilisation des marqueurs moléculaires de type microsatellites (SSR: «single sequence repeat»), comme ceux identifiés lors du séquençage des extrémités de clones BAC de *C. canephora* par exemple (Leroy *et al.*, 2005). Une recherche de QTL («Quantitative Trait Loci») associés au caractère de tolérance à la sécheresse sera effectuée. L'objectif de cette carte sera de valider les GC en les cartographiant.

#### E.2.5. Effets du stress hydrique sur la qualité organoleptique de la boisson

Ce projet prévoit également d'analyser l'impact de la sécheresse sur les composés essentiels du grain de café. En effet, des travaux ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre la tolérance au stress hydrique et la qualité organoleptique («qualité à la tasse») de la boisson (Montagnon, 2000). Par exemple, les génotypes du groupe Guinéen et du sous-groupe SG1 des Congolais, respectivement considérés comme très résistants et moyennement résistants pour la sécheresse, ont une qualité médiocre à la tasse. A l'inverse, les génotypes du sous-groupe SG2 de Congolais avec une bonne qualité de la boisson, sont connus comme étant très sensibles à la sécheresse (Montagnon, 2000). L'impact des conditions éco-physiologiques sur la composition des principaux composés biochimiques du grain (saccharose, sucres réducteurs, lipides, trigoneline, protéines, caféine et acides chlorogéniques) sera analysé sur le café vert récolté à partir de caféiers cultivés dans différentes conditions de régime hydrique. Cette analyse s'effectuera à la fois par la technique de spectrophotométrie en proche infrarouge («NIRS») et par spectrométrie de masse (Embrapa Ressources Génétiques et Biotechnologie). Des tests organoleptiques de qualité de la boisson seront réalisés (Cirad, Incaper). La comparaison de ces données pourrait donner lieu au développement de systèmes de culture permettant d'améliorer la qualité des cafés.

### **E.3. Conclusions et perspectives**

L'approche scientifique de ce projet est basée sur la compréhension des mécanismes moléculaires d'adaptation à la contrainte hydrique du caféier. A moyen terme, les résultats attendus de ce projet consistent en l'identification de GC impliqués dans la tolérance à la sécheresse, préalable indispensable au développement de stratégies utilisant la transformation génétique et la sélection assistée par marqueurs (SAM).

- Développer et dynamiser les partenariats scientifiques nationaux et internationaux

Ce projet prévoit l'intervention de plusieurs chercheurs spécialistes du caféier des différentes institutions nationales et internationales dans les domaines de la génétique et amélioration du caféier (Incaper, Cirad), de l'écophysiologie (Embrapa CPAC, Cirad, Université Viçosa), de la biologie moléculaire (Embrapa Cenargen, Cirad), de la spectrométrie (Embrapa Cenargen, Cirad), de la technologie alimentaire (Cirad, Incaper) et de

l'analyse statistique et traitement des données (Embrapa Cenargen, Cirad). Au total, cette coopération prévoit la participation directe d'au moins 15 chercheurs.

Elle s'appuiera aussi sur les compétences disponibles dans l'UMR DAP (Développement et Amélioration des plantes), en particulier au sein des équipes BURST (Biologie cellulaire de Réponse aux Stress chez les espèces Tropicales), SRG (Structure des Ressources Génétiques) et DAR (Développement Adaptatif du Riz). Ce projet est aussi l'une des composantes de l'ATP (Action Thématique Programmée-Cirad) «Plasticité phénotypique des plantations pérennes sous contrainte hydrique au champ», récemment approuvée (2007-2009), qui prévoit d'étudier le pin maritime et l'eucalyptus en plus du caféier. Cette ATP devrait également permettre de renforcer les collaborations avec les équipes de l'INRA (Pierroton par exemple) grâce à une complémentarité des outils (recherche de GC à l'aide de lames de type «micro-array») et à une convergence des approches (recherche de marqueurs moléculaires associés aux GC et de QTL de tolérance à la sécheresse) commune à ces trois plantes pérennes.

Enfin, au niveau international, ce projet s'inscrit dans le cadre d'un partenariat scientifique entre le Cirad, l'Embrapa Cenargen, l'Embrapa Cerrado et l'Incapar portant sur l'étude de la tolérance à la sécheresse chez le caféier. Il a fait l'objet d'un Projet de Coopération Technique récemment approuvé par l'Agence Brésilienne de Coopération et l'ambassade de France au Brésil pour une période de trois ans (2006-2009) renouvelable.

➤ Appui financier au projet de recherche

Ce projet bénéficiera du soutien financier de plusieurs bailleurs de fonds : Ambassade de France au Brésil, Consortium brésilien de recherche et développement du café, Finep, CNPq, ATP-Cirad. Par ailleurs, il pourra servir de base au montage de projets plus ambitieux (appel d'offre de projet ANR ou 7<sup>ème</sup> PCRD de l'union européenne), visant à étudier les bases génétiques de la variabilité phénotypique pour la tolérance au stress hydrique et l'impact du stress hydrique sur la qualité des produits des plantes pérennes.

➤ Accueil, formation et échange de matériel

Pour augmenter les connaissances et favoriser les échanges d'expérience entre chacune des institutions partenaires, ce projet prévoit l'accueil et la formation de chercheurs et d'étudiants à travers la réalisation de stages de courte et moyenne durée (bourses CAPES-Cofecub, Marie Curie...). Il prévoit aussi des échanges de matériel comme des clones BAC de *C. canephora* pour la recherche de GC ou de marqueurs moléculaires. Le matériel génétique qui fera l'objet d'échanges entre les institutions partenaires du projet, sera envoyé sous forme de feuilles, d'ADN déjà extrait ou de plantules. Ces envois seront effectués en respectant les règles phytosanitaires en vigueur dans chacun des pays. Les échanges de matériels et d'informations (séquences) entre les institutions partenaires du projet seront régis par des documents de type MTA («Material Transfert Agreement») qui préciseront leurs conditions d'utilisation. Ainsi, l'utilisation du matériel transféré du Cirad vers les institutions brésiliennes sera régie par un MTA-type du Cirad. A l'inverse, l'utilisation du matériel transféré des institutions brésiliennes vers le Cirad sera régie par un MTA-type de l'Embrapa.

Dans leur ensemble, l'accueil et la formation ainsi que les échanges de matériel entre les partenaires devraient contribuer au renforcement des liens de coopération technique et scientifique entre le Cirad, l'INRA et les différents centres de recherche brésilien partenaires de ce projet.

## Références bibliographiques:

- Acuña R, Bassiner R, Beillinson V, Cortina H, Cadena-Gómez G, Montes V, Nielsen NC (1999) Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiol Plant* 105: 122-131
- AGI: The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Alpizar E, Dechamp E, Espeout S, Royer M, Lecouls AC, Nicole M, Bertrand B, Lashermes P, Etienne H (2006) Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Rep* 25: 959-967
- Amorim HV, Teixeira AA, Melo M, Cruz VF, Malavolta E (1975) Chemistry of Brazilian green coffee and quality of the beverage. IV. Electrophoresis of soluble proteins in agar-gel and its interaction with chlorogenic acids. *Turrialba* 25: 18-25
- Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L (1998) Evolution of light-regulated plant promoters. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 525-555
- Arnold U, Ludwig E, Kühn R, Möschwitzer U (1994) Analysis of free amino acids in green coffee bean. I. Determination of amino acids after precolumn derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. *Z Lebensm Unters Forsch* 199: 22-25
- Arnold U, Ludwig E (1996) Analysis of free amino acids in green coffee bean. II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Z Lebensm Unters Forsch* 203: 379-384
- Avelino J, Barboza B, Araya JC, Fonseca C, Davrieux F, Guyot B, Cilas C (2005) Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude *terroirs* of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *J Sci Food Agric* 85: 1869-1876
- Ashihara H, Monteiro AM, Gillies FM, Crozier A (1996) Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiol* 111: 747-753
- Barel M, Jacquet M (1994) La qualité du café : ses causes, son appréciation, son amélioration. *Plant Rech Develop* 1: 5-13
- Baptista CG, Mazzafera P, Priolli RHG, Shimizu MM, Schocken NRL, Colombo C (2005) Identificação e caracterização de ESTs presentes no banco do genoma café relacionados a proteases. In: IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Londrina (PR), CD-rom
- Baú SMT, Mazzafera P, Santoro LG (2001) Seed storage proteins in coffee. *Rev Bras Fisiol Veg* 13: 33-40
- Baud S, Vaultier MN, Rochat C (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 55: 397-409
- Belotserkovsky H, Berger Y, Shahar R, Wolf S (2007) Specific role of *LeMAN2* in the control of seed germination exposed by overexpression of the *LeMAN3* gene in tomato plants. *Planta* 227: 199-209
- Berthaud J (1986) Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. ORSTOM, Travaux et documents n° 188. ORSTOM, Paris
- Berthaud J, Charrier A (1988) Genetic Resources of *Coffea*. In: Clarke RJ and Macrae R (eds) *Coffea Agronomy*, Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Amsterdam, pp 1-42
- Bertrand B (2002) L'amélioration génétique de *Coffea arabica* L en Amérique Centrale par la voie hybride F1. Thèse Université, ENSA Montpellier, France
- Bertrand C, Noirot M, Doubeau S, de Kochko A, Hamon S, Campa C (2003) Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Qualitative comparison with leaves. *Plant Sci* 165: 1355-1361
- Bertrand B, Etienne H, Lashermes P, Guyot G, Davrieux F (2005) Can near-infrared reflectance of green coffee be used to detect introgression in *Coffea arabica* cultivars? *J Sci Food Agric* 85: 955-962
- Bewley JD (1997) Breaking down the walls - a role for endo- $\beta$ -mannanase in release from seed dormancy. *Trends Plant Sci* 2: 464-469
- Bewley JD, Burton RA, Morohashi Y, Fincher GB (1997) Molecular cloning of a cDNA encoding a (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta* 203: 454-459
- Bewley JD, Banik M, Bourgault R, Feurtado JA, Toorop P, Hilhorst HWM (2000) Endo- $\beta$ -mannanase activity increases in the skin and outer pericarp of tomato fruits during ripening. *J Exp Bot* 51: 529-538
- Biehl B, Wewetzer C, Passern D (1982) Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. *J Sci Food Agric* 33: 1291-1304
- Biehl B, Brunner E, Passern D, Quesnel VC, Adomako D (1985) Acidification, proteolysis and flavour potential in fermentating cocoa beans. *J Sci Food Agric* 36: 583-598
- Bogue MA, Vonder Haar RA, Nuccio ML, Griffing LR, Thomas TL (1990) Developmentally regulated expression of a sunflower 11S seed protein gene in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 222: 49-57
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111
- Bourgault R, Bewley JD (2002) Variation in its C-terminal amino acids determines whether endo- $\beta$ -mannanase is active or inactive in ripening tomato fruits of different cultivars. *Plant Physiol* 130: 1254-1262
- Bourgault R, Oakley AJ, Bewley JD, Wilce MCJ (2005) Three dimensional structure of (1,4)- $\beta$ -D-mannan mannanohydrolase from tomato fruit. *Protein Sci* 14: 1233-1241
- Bradbury AGW, Halliday DJ (1990) Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *J Agric Food Chem* 38: 389-392
- Bradbury AGW, Atkins EDT (1997) Factors affecting mannan solubility in roast coffee extracts. ASIC - 17<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee - Nairobi: 128-132
- Bradbury AGW (2001) Chemistry I. Non-volatile compounds 1A: carbohydrates. In: Clarke RJ, Vitzthum OG (eds) *Coffee, recent developments*, Blackwell Science, London, pp 3-6
- Bridson D, Verdcourt B (1988) *Coffea*. In: Polhill (ed) *Flora of Tropical East Africa. Rubiaceae (Part 2) Coffea*, Balkema, Rotterdam
- Bouchet S (2005) Diversité nucléotidique et évolution moléculaire de cinq gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du saccharose au sein du genre *Coffea*. Rapport Master STS, Université Rennes, France
- Buckeridge MS, Dietrich SMC (1995) Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Sci* 117: 33-43
- Bytof G, Selmar D, Schieberle P (2000) New aspects of coffee processing: how do the different post harvest treatments influence the formation of potential flavour precursors? *J Appl Bot* 74: 131-136
- Campa C, Ballester JE, Doubeau S, Dussert S, Hamon S, Noirot M (2004) Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chem* 88: 39-44
- Carchon H, De Bruyne CK (1975) Purification and properties of coffee bean  $\alpha$ -D-galactosidase. *Carbohydr Res* 41: 175-189
- Casal S, Oliveira MB, Ferreira MA (2000) HPLC/diode-array to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. *Food Chem* 68: 481-485
- Casal S, Oliveira MBPP, Alves MR, Ferreira MA (2001) Characterization of free amino acid enantiomers of Arabica and Robusta coffee varieties. ASIC - 19<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee - Trieste, CD-rom C320
- Chabrillange N, Dussert S, Engelmann F, Doubeau S, Hamon S (2000) Dessiccation tolerance in relation to soluble sugar contents in seeds of 10 coffee (*Coffea* L.) species. *Seed Sci Res* 10: 393-396
- Clifford MN (1985) Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Clifford MN and Wilson KC (Eds) *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*, pp. 305-375. Croom Helm, London
- Courtois JE, Petek F (1966)  $\alpha$ -Galactosidase from coffee beans. *Meth Enzymol* 8: 565-571
- Cubry P, Pot D, De Bellis F, Legnath H, Musoli P, Leroy T (2008) Genetic structure of *Coffea canephora* Pierre species assessed by microsatellites markers. *Plant & Animal Genomes XVI Conference*, San Diego (CA), USA, W112
- da Silva EAA (2002) Coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination: mechanism and regulation. Thèse Université Wageningen Hollande
- da Silva EAA, Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HWM (2004) Absciscic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea Arabica* cv. *Rubi*) seed germination. *Planta* 220: 251-261
- da Silva EAA, Toorop PE, Nijse J, Bewley JD, Hilhorst HWM (2005) Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination and cause cell death in the embryo. *J Exp Bot* 56: 1029-1038
- De Castro RD, Marraccini P (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz J Plant Physiol* 18: 175-199
- de Oliveira MPA (2007) Expressão de genes da biossíntese de cafeína em frutos e endospermas de *Coffea arabica*: sem cafeína. Dissertation de Post-graduation. Institut Agronomique de Campinas (IAC), São Paulo, 60 pages
- DaMatta FM, Ramalho JDC (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz J Plant Physiol* 18: 55-81
- DaMatta FM, Silveira JSM, Ducatti C, Loureiro M (2000) Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: I Simpósio de Pesquisa de Cafés do Brasil, Poços de Caldas: Embrapa Café, Minasplan vol 2: 907-910

- DaMatta FM, Chaves ARM, Pinheiro HA, Ducatti C, Loureiro ME (2003) Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Sci* 164: 111-117
- Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, Stoffelen P (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot J Linn Soc* 152: 465-512
- De Maria CAB, Trugo LC, Moreira RFA, Werneck CC (1994) Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. *Food Chem* 50: 141-145
- Decazy F, Avelino J, Guyot B, Perriot JJ, Pineda C, Cilas C (2003) Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. *J Food Sci* 68: 2356-2361
- Dufour M, Hamon P, Noirot M, Risterucci AM, Brottier P, Vico V, Leroy T (2001) Potential use of SSR markers for *Coffea* spp. genetic mapping. ASIC - 19<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee - Trieste, CD-rom-B225
- Dussert D, Lashermes P, Anthony F, Montagnon C, Trouslot P, Combes MC, Berthaud J, Noirot M, Hamon S (1999) Le caféier *Coffea canephora*. In : Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (eds), Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. Cirad, Montpellier, France, pp 175-194
- Doyle JJ, Schuler MA, Godette WD, Zenger V, Beachy RN, Slightom JL (1986) The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*: structural homologies of genes and proteins. *J Biol Chem* 261: 9228-9238
- Edwards M, Scott C, Gidley NJ, Grant-Reid JS (1992) Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. *Planta* 187: 66-74
- Eira MTS, da Silva EAA, De Castro RD, Dussert S, Walters C, Bewley JD, Hilhorst HWM (2006) Coffee seed physiology. *Braz J Plant Physiol* 18: 149-163
- Etienne H, Anthony F, Dussert S, Fernandez D, Lashermes P, Bertrand B (2002) Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In *Vitro Cell Dev Biol* 38: 129-138
- Ferrão RG, Silveira JSM, Fonseca AFA, Bragança SM, Ferrão MAG (1999) EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca. Comunicado Técnico Vitória (ES) ISSN 0101-7693: 1-10
- Ferrão RG, Fonseca AFA, Silveira JSM, Ferrão MAG, Bragança SM (2000) EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. *Rev Ceres* 273: 555-560
- Feurtado JA, Banik M, Bewley JD (2001) The cloning and characterization of  $\alpha$ -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *J Exp Bot* 52: 1239-1249
- Filichkin SA, Leonard JM, Monteros A, Liu PP, Nonogaki H (2004) A novel endo- $\beta$ -mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol* 134: 1080-1087
- Fischer M, Reimann S, Trovato V, Redgwell RJ (2001) Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydr Res* 330: 93-101
- Flament I (1991) Coffee, cacao and tea. In: H. Maarse (Ed.) Volatiles compounds in foods and beverages, Marcel Dekker, New-York pp 617-669
- Fuhr R (1993) Light-regulated promoter sequences in the multigene *Cab* and *rbcS* gene family, in: SB Gelvin, RA Schilperoort, DPS Verma (Eds.), *Plant Molecular Biology* Manuel, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp B12/1-B12/19
- Frischknecht PM, Ulmer-Dufek J, Baumann TW (1986) Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: expression of an optimal defense strategy? *Phytochem* 25: 613-616
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, a new cell wall loosening enzyme activity from plants. *Biochem J* 282: 821-828
- Fu H, Park WD (1995) Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* 7: 1369-1385
- Gaborit C, Caillet V, Deshayes A, Marraccini P (2003) Molecular cloning of a full-length cDNA and gene from *Coffea arabica* encoding a protein homologous to the yeast translation initiation factor SUI1: expression analysis in plant organs. *Braz J Plant Physiol* 15: 55-58
- Galtier N, Foyer CH, Huber J, Voelker TA, Huber SC (1993) Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning, and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var UC82B). *Plant Physiol* 101: 535-543
- Geromel C, Ferreira LP, Cavalari AA, Pereira LFP, Guerreiro SMC, Vieira LGE, Leroy T, Pot D, Mazzafera P, Marraccini P (2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *J Exp Bot* 57: 3243-3258
- Geromel C, Ferreira LP, Bottcher A, Pot D, Pereira LFP, Leroy T, Vieira LGE, Mazzafera P, Marraccini P (2008a) Sucrose metabolism during fruit development in *Coffea racemosa*. *Ann Appl Bot* 152: 179-187
- Geromel C, Ferreira LP, Davrieux F, Guyot B, Ribeyre F, dos Santos Scholz MB, Pereira LFP, Vaast P, Pot D, Leroy T, Andriocili Filho A, Vieira LGE, Mazzafera P, Marraccini P (2008b) Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee fruits. *Plant Physiol Biochem* 46: 569-579.
- Giorgini JF, Comoli E (1996) Effect of embryo and exogenous GA3 on endospermic endo- $\beta$ -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. *Rev Bras Fisiol Veg* 8: 43-49
- Gittins JR, Pellny TK, Hiles ER, Rosa C, Biricolti S, James DJ (2000) Transgene expression driven by heterologous ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* Mill.). *Planta* 210: 232-240
- Goldberg RB, Baker SJ, Perez-Grau L (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56 149-160
- Golden KD, John MA, Kean EA (1993)  $\beta$ -galactosidase from *Coffea arabica* and its role in fruit ripening. *Phytochem* 34: 355-360
- Gong X, Bewley JD (2007) Sorting out the *LeMANs*: endo- $\beta$ -mannanase genes and their encoded proteins in tomato. *Seed Sci Res* 17: 143-154
- Gray J (2005) Guard cells: transcription factors regulate stomatal movements. *Curr Biol* 15: 593-595
- Grosch W (2001) Volatile compounds. In: Clarke RJ and Vitzthum OG (Eds) *Coffee: recent developments*, Blackwell Science, Oxford pp 68-89
- Guerreiro Filho O (1992) *Coffea racemosa* Lour: une revue. *Café Cacao Thé* 36: 171-186
- Guyot B, Petnga E, Vincent JC (1988) Analyse qualitative d'un café *Coffea canephora* var. Robusta en fonction de la maturité. I. Evolution des caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques. *Café Cacao Thé* 32: 127-130
- Guyot B, Manez JC, Perriot JJ, Giron J, Villain L (1996) Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés arabica. *Plant Rech Dév* 3: 272-280
- Haibach F, Hata J, Mitra M, Dhar M, Harmata M, Sun P, Smith D (1991) Purification and characterization of a *Coffea canephora*  $\alpha$ -D-galactosidase isozyme. *Biochem Biophys Res Comm* 181: 1564-1571
- Harding PE, Bleeker P, Freyne DF (1987) Land suitability evaluation for rainfed Arabica coffee production: western highlands province, Papua New Guinea. *Coffee Res Rep* 4. Coffee Industry Corporation, 39 pp
- Hesse H, Willmitzer L (1996) Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol Biol* 30: 863-872
- Hinniger C, Caillet V, Michoux F, Ben Amor M, Tanksley S, Lin C, McCarthy J (2006) Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. *Ann Bot* 97: 755-765
- Ho C-T, Hwang H-I, Yu T-H, Zhang J (1993) An overview of the Maillard reactions related to aroma generation in coffee. ASIC - 15<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee - Montpellier: 519-527
- Hofmann T (1999) Influence of L-cysteine on the formation of bitter-tasting aminohexose reductones from glucose and L-proline: identification of a novel furo[2,3-b]thiazine. *J Agric Food Chem* 47: 379-390
- Hofmann T, Bors W, Stettmaier K (1999) Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J Agric Food Chem* 47: 4763-4768
- Homma S (2001) Non-volatile compounds, part II. In: Clarke RJ and Vitzthum OG (Eds) *Coffee: recent developments*, Blackwell Science, Oxford, pp 50-67
- ICO International Coffee Organization (2002) Coffee quality - Improvement programme - Implementation, ICC Resolution No 407, 3 p
- Ivy JM, Clements DE (2001) DNA encoding recombinant coffee bean alpha-galactosidase. US Patent N° 6329191
- Kirchhoff PM, Biehl B, Crone G (1989) Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chem* 31: 295-311
- Kumar V, Satyanarayana KV, Ramakrishna A, Chandrashekar A, Ravishankar GA (2007) Delivery of N-methyltransferase and 11S globulin promoters of *Coffea canephora* Pex Fr. by tissue electroporation and analysis of transformational events. *Curr Sci* 93: 77-81
- Knopp S, Bytof G, Selmar D (2006) Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *Eur Food Res Technol* 223: 195-201
- Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, Omura M, Akihama T (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *J Exp Bot* 53: 61-71
- Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M (2001) Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem* 75: 223-230
- Lam E, Chua N-H (1990) GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science* 248: 471-474

- Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, Charrier A (1999). Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet* 261: 259-266
- Lepelley M, Cheminade G, McCarthy JG, Petiard V, Lin C, Tanksley SD (2007a) Polynucleotides encoding lignin biosynthetic pathway enzymes in coffee, WO/2007/047518
- Lepelley M, Cheminade G, McCarthy JG, Petiard V, Lin C, Tanksley SD (2007b,c) Polynucleotides encoding phenylpropanoid and flavonoid biosynthetic pathway enzymes in coffee, WO/2007/044992 et WO/2007/044751
- Leroy T, Henry AM, Royer M, Altosaar I, Frutos R, Duris D, Philippe R (2000) Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep* 19: 382-389
- Leroy T, Marraccini P, Dufour M, Montagnon C, Lashermes P, Sabau X, Ferreira LP, Jourdan I, Pot D, Andrade AC, Glaszmann JC, Vieira LGE, Piffanelli P (2005) Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. *Theor Applied Genet* 111: 1032-1041
- Leroy T, Ribeyre F, Bertrand B, Charmetant P, Dufour M, Montagnon C, Marraccini P, Pot D (2006) Genetics of coffee quality. *Braz J Plant Physiol* 18: 229-242
- Leroy T, Cubry P, Durand N, Dufour M, De Bellis F, Jourdan I, Vieira LGE, Musoli P, Aluka P, Legnaté H, Marraccini P, Pot D (2007) *Coffea* spp. and *Coffea canephora* diversity evaluated with microsatellites and SNPs. Lessons from comparative analysis. ASIC - 21<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee - Montpellier, p 827-834
- Lin C, Mueller LA, McCarthy J, Crouzillat D, Pétiard V, Tanksley S (2005) Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor Applied Genet* 112: 114-130
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water stress. *Env Exp Bot* 47: 239-247
- Macrae R (1985) Nitrogenous components. In *Coffee*, Vol 1: Chemistry; Clarke, R J, Macrae, R, Eds; Elsevier Applied Science Publishers: London, UK, 1985; pp 137-152
- Maga JA (1981) Pyridines in foods. *J Agric Food Chem* 29: 895-898
- Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoïdines par voie méthodique. *C R Acad Sci* 154: 66-68
- Maranville E, Zhu A (2000a) The carboxy terminus of coffee bean  $\alpha$ -galactosidase is critical for enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* 373: 225-230
- Maranville E, Zhu A (2000b) Assessment of amino-acid substitutions at tryptophan 16 in  $\alpha$ -galactosidase. *Eur J Biochem* 267: 1495-1501
- Marraccini P, Deshayes A, Pétiard V, Rogers WJ (1999) Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol Biochem* 37: 273-282
- Marraccini P, Allard C, André ML, Courjault C, Gaborit C, Lacoste N, Meunier A, Michaux S, Petit V, Priyono P, Rogers WJ, Deshayes A (2001a) Update on coffee biochemical compounds, protein and gene expression during bean maturation and in other tissues. ASIC - 19<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee - Trieste, CD-rom B214
- Marraccini P, Rogers WJ, Allard C, André ML, Caillet V, Lacoste N, Lausanne F, Michaux S (2001b) Molecular and biochemical characterization of endo- $\beta$ -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213: 296-308
- Marraccini P, Courjault C, Caillet V, Lausanne F, Lepage B, Rogers WJ, Tessereau S, Deshayes A (2003) Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol Biochem* 41: 17-25
- Marraccini P, Rogers WJ, Caillet V, Deshayes A, Granato D, Lausanne F, Lechat S, Pridmore D, Pétiard V (2005) Biochemical and molecular characterization of  $\alpha$ -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiol Biochem* 43: 909-920
- Maurel C, Chrispeels MJ (2001) Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol* 125: 135-138
- Mayer F, Czerny M, Grosch W (2000) Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverage. *Euro Food Res Technol* 211: 272-276
- Mazzafera P, Gonçalves KV (1999) Nitrogen compounds in the xylem sap of coffee. *Phytochem* 50: 383-386
- McCarthy J, Ben Amor M, Pétiard V, Tanksley S (2004) Modulation of coffee flavour precursor levels in green coffee grains. Patent WO 2004/113520
- McCleary BV (1983) Enzyme interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of the exo- $\beta$ -mannanase. *Phytochem* 22: 649-658
- Melo M, Amorim HV (1975) Chemistry of Brazilian green coffee and quality of the beverage. VI. U.V and visible spectral analysis and chlorogenic acids content on TCA soluble buffer extracts. *Turrialba* 25: 243-248
- Migge A, Carrayol E, Hirel B, Becker TW (2000) Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* 210: 252-260
- Montagnon C, Leroy T, Yapo A (1992) Diversité génotypique et phénotypique de quelques groupes de caféiers (*Coffea canephora* Pierre) en collection. Conséquences sur leur utilisation en sélection Café Cacao Thé 36: 187-198
- Montagnon C, Leroy T (1993) Réaction à la sécheresse de jeunes caféiers *Coffea canephora* de Côte-d'Ivoire appartenant à différents groupes génétiques. *Café Cacao Thé* 37: 179-189
- Montagnon C, Leroy T, Eskes AB (1998) Amélioration variétale de *Coffea canephora*. I. Critères et méthodes de sélection. *Plant Rech Dev* 5: 18-33
- Montagnon C (2000) Optimisation des gains génétiques dans le schéma de sélection récurrente réciproque de *Coffea canephora* Pierre. Thèse Université, ENSA Montpellier, France
- Montavon P, Mauron AF, Duruz E (2003) Changes in green coffee protein profiles during roasting. *J Agric Food Chem* 51: 2335-2343
- Muller LL, Jacks TJ (1983) Intracellular distribution of free sugars in quiescent cottonseed. *Plant Physiol* 51: 914-916
- Nicolas P, Raetz E, Reymond S, Sauvageat JL (1994) Hydrolyse de café avec une bêta-mannanase immobilisée. US Patent n° 5714183
- Nonogaki H, Nomaguchi M, Morohashi Y (1995) Endo- $\beta$ -mannanase in the endosperm of germinated tomato seeds. *Physiol Plant* 94: 328-334
- Nonogaki H, Morohashi Y (1996) An endo- $\beta$ -mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol* 110: 555-559
- Nonogaki H, Gee OH, Bradford KJ (2000) A germination-specific endo- $\beta$ -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiol* 123: 1235-1245
- Obendorf RL (1997) Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Sci Res* 7: 63-74
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623
- Ogita S, Uefuji H, Morimoto M, Sano H (2005) Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol* 54: 931-941
- Patrick JW, Offler CE (1995) Post-sieve element transport of sucrose in developing seeds. *Austr J Plant Physiol* 22: 681-702
- Pattanagul W, Madore MA (1999) Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in *Coleus*. *Plant Physiol* 121: 987-993
- Perriot JJ, Ribeyre F, Montagnon C (2006) Coffee: terroirs and qualities. In: Montagnon C (ed.). *Ed. Quae, Versailles*, p. 11-20
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci* 167: 1307-1314
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C (2005) Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Ann Bot* 96: 1001-1008
- Plant AR, Moore KG (1983) The protein, lipid and carbohydrate composition of protein bodies of *Lupinus angustifolia* seeds. *Phytochem* 22: 2359-2363
- Poncet V, Rondeau M, Tranchant C, Cayrel A, Hamon S, de Kochko A, Hamon P (2006) SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. *Mol Gen Genomics* 276: 436-449
- Pot D, Bouchet S, Marraccini P, De Bellis F, Cubry P, Jourdan I, Pereira LFP, Vieira LGE, Ferreira LP, Musoli P, Legnaté H, Leroy T (2006) Nucleotide diversity of genes involved in sucrose metabolism. Towards the identification of candidate genes controlling sucrose variability in *Coffea* spp. ASIC - 21<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science, Montpellier, CD-rom B209
- Poisson J (1977) Aspects chimiques et biologiques de la composition du café ASIC - 8<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee - Abidjan, pp 33-57
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2005) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environ Exp Bot* 56: 263-273
- Privat I, McCarthy JG, Pétiard V, Lin C, Tanksley SD (2007a) Invertase and inhibitors from coffee, WO/2007/038566
- Privat I, McCarthy JG, Pétiard V, Lin C, Tanksley SD (2007b) Nucleic acids and proteins associated with sucrose accumulation in coffee, WO/2007/022318
- Redgwell R, Curti D, Fischer M, Nicolas P, Fay L (2002) Coffearabinogalactans: acidic polysaccharides covalently linked to proteins. *Carbohydr Res* 337: 239-253

- Redgwell RJ, Curti D, Rogers J, Nicolas P, Fischer M (2003) Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications for *in vivo* modification of galactomannan synthesis. *Planta* 217: 316-326
- Reid JSG, Meier H (1973) Enzymatic activities and galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L. *Leguminosae*). Secretion of  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112: 301-308
- Reid JSG, Edwards M, Gidley MJ, Clark AH (1995) Enzyme specificity in galactomannan biosynthesis. *Planta* 195: 489-495
- Ribas AF, Kobayashi AK, Cação SMB, Pereira LFP, Ayub RA, Vieira LGE (2003) Transformação genética de *Coffea canephora* P. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com gene heterólogo de ACC-oxidase na orientação anti-senso. Anais do III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Porto Seguro, Bahia, Brasil, pp 106-107
- Ribas AF, Galvão, RM, Pereira LFP, Vieira LGE (2005a) Transformação de *Coffea arabica* com o gene da ACC oxidase em orientação antisenso. 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, pp 492
- Ribas AF, Kobayashi AK, Pereira LFP, Vieira LGE (2005b) Genetic transformation of *Coffea canephora* P. by particle bombardment. *Biol Plant* 49: 493-497
- Ribas AF, Pereira LFP, Vieira LGE (2006a) Genetic transformation of coffee. *Braz J Plant Physiol* 18: 83-94
- Ribas AF, Kobayashi AK, Pereira LFP, Vieira LGE (2006b) Production of herbicide-resistant coffee plants (*Coffea canephora* P.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Braz Arc Biol Technol* 49: 11-19
- Rogers WJ, Bézard G, Deshayes A, Meyer I, Pétiard V, Marraccini P (1999a) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol Biochem* 37: 261-272
- Rogers WJ, Michaux S, Bastin M, Bucheli P (1999b) Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Sci* 149: 115-123
- Rohan TA (1964) The precursors of chocolate aroma: a comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J Food Sci* 29: 456-459
- Röhrig H, John M, Schmidt J (2004) Modification of soybean sucrose synthase by S-thiolation with ENOD40 peptide A. *Biochem Biophys Res Comm* 325: 864-870
- Roitsch T, González MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* 9: 606-613
- Salmona J, Dussert S, Descroix F, de Kochko A, Bertrand B, Joët T (2008) Deciphering transcriptional networks that govern coffee arabica seed development using combined cDNA array and real-time rt-pcr approaches. *Plant Mol Biol* 66: 105-124
- Scherthauer JP, Matzke MA, Matzke AJ (1988) Endosperm-specific activity of a zein gene promoter in transgenic tobacco plants. *EMBO J* 7: 1249-1255
- Schröder R, Wegrzyn TF, Bolitho KM, Redgwell RJ (2004) Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta* 219: 590-600
- Schröder R, Wegrzyn TF, Sharma NN, Atkinson RG (2006) LeMAN4 endo- $\beta$ -mannanase from ripe tomato fruit can act as a mannan transglycosylase or hydrolase. *Planta* 224: 1091-1102
- Selman D, Bytof G, Knopp SE (2001) New aspects of coffee processing: The relation between seed germination and coffee quality. ASIC - 19th International Scientific Colloquium on Coffee - Trieste, CD-rom C326
- Shewry PR (1995) Plant storage proteins. *Biol Rev* 70: 375-426
- Shibamoto T (1991) An overview of coffee aroma and flavor chemistry. ASIC - 14th International Scientific Colloquium on Coffee - San Francisco
- Shirsat AH, Wilford N, Croy R, Boulter D (1988) Sequences responsible for tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol Gen Genet* 215: 326-331
- Shirsat AH (1991) Control of gene expression in the developing seed, in: Grierson D (Ed.), *Developmental Regulation of Plant Gene Expression*, Chapman and Hall, New York, pp 153-181
- Silva EA, Mazzafera P, Brunini O, Sakai E, Arruda FB, Mattoso LHC, Carvalho CRL, Pires RCM (2005) The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. *Braz J Plant Physiol* 17: 229-238
- Silva CO (2006) Purificação e caracterização de uma alfa-galactosidase de endosperma de *Coffea arabica* var. Mundo Novo, e sua importância no processo de biossíntese do manano de reserva. Thèse Université Campinas (Unicamp), SP-Brasil
- Silva LP, Vinecky F, Barbosa EA, Andrade AC, Bloch Jr C (2006) Imaging mass spectrometry as an innovative tool to study coffee fruit development. ASIC - 21th International Conference on Coffee Science, Montpellier, CD-rom PC351
- Silvarolla MB, Mazzafera P, Fazuoli LC (2004) A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature* 429: 826
- Silveira SR, Ruas PM, Ruas CF, Sera T, Carvalho VP, Coelho ASG (2003) Assessment of genetic variability within and among progenies and cultivars of coffee using RAPD markers. *Gen Mol Biol* 26: 329-336
- Silwar R, Lüllman C (1993) The aroma composition of the coffee beverage. Quantitative determination of steam-volatile aroma constituents. ASIC - 15th International Scientific Colloquium on Coffee - Montpellier: 873-879
- Simkin AJ, Qian T, Caillet V, Michoux F, Ben Amor M, Lin C, Tanksley S, McCarthy J (2006) Oleosin gene family of *Coffea canephora*: Quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain. *J Plant Physiol* 163: 691-708
- Simkin AJ, McCarthy J, Pétiard V, Tanksley S, Lin C (2007) Oleosin genes and promoters from coffee WO/2007/005928
- Spiller MA (1998) The chemical components of coffee. In: Caffeine, Spiller GA, ed, CRC Press, 103-167
- Stalker DM, McBride KE, Malyj LD (1988) Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene *Science* 242: 419-423
- Steiger D, Nagai C, Moore P, Morden C, Osgood R, Ming R (2002) AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theor Applied Genet* 105: 209-215
- Stiles JI (2001) Agronomy III: Molecular Biology. In: Clarke RJ and Vitzthum OG, eds. *Coffee: recent developments*, Oxford: Blackwell Science, pp 224-234
- Stöger E, Williams S, Keen D, Christou P (1999) Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control. *Transgenic Res* 8: 73-82
- Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plant are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4: 401-404
- Tanksley S, Lin C, Ben Amor M, McCarthy J, Pétiard V (2007) Dehydrin genes and promoters from coffee WO/2007/005980
- Vaast P, Angrand J, Franck N, Dautaz J, Génard M (2005) Fruit load and branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in the field. *Tree Physiol* 25: 753-760
- Vaast P, Bertrand B, Perriot JJ, Guyot B, Génard M (2006) Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *J Sci Food Agric* 86: 197-204
- Van der Vossen HAM (2001) Agronomy I: Coffee breeding practices In: Clarke RJ and Vitzthum OG (Eds) *Coffee: recent developments*, Blackwell Science, Oxford, pp 197-201
- Vieira LGE, Andrade AC, Colombo CA, Moraes AAH, Metha A, Oliveira AC, Labate CA, Marino CL, Monteiro-Vitorello CB, Monte DC, Giglioti E, Kimura ET, Romano E, Kuramae EE, Lemos EGM, Almeida ERP, Jorge EC, Barros EVSA, da Silva FR, Vinecky F, Sawazaki HE, Dorry HFA, Carrer H, Abreu IN, Batista JAN, Teixeira JB, Kitajima JP, Xavier KG, Lima LM, Camargo LEA, Pereira LFP, Coutinho LL, Lemos MVF, Romano MR, Machado MA, Costa MMC, Grossi de Sá MF, Goldman MHS, Ferro MIT, Tinoco MLP, Oliveira MC, Sluys MAV, Shimizu MS, Maluf MP, Eira MTS, Guerreiro Filho O, Arruda P, Mazzafera P, Mariani PDSC, Oliveira RL, Harakava R, Balbao SF, Tsai SM, Mauro SMZ, Santos SN, Siqueira WJ, Costa GGL, Formighieri EF, Carazzolle MF, Pereira GAG (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18: 95-108
- Vinecky F, de Brito KM, Da Silva FR, Andrade AC (2005) Análise *in silico* de genes potencialmente envolvidos na resposta aos estresses abióticos, presentes na base de dados do projeto Genoma café. IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Londrina-PR, Embrapa Café, CD-rom
- Voigt J, Wrann D, Heinrichs H, Biehl B (1994) The proteolytic formation of essential cocoa-specific aroma precursors depends on particular chemical structures of the vicilin-class globulin of the cocoa seeds lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds. *Food Chem* 51: 197-205
- Winter H, Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Plant Sci* 19: 31-67
- Wang A, Li J, Bewley D (2004) Molecular cloning and characterization of an endo-beta-mannanase gene expressed in the lettuce endosperm following radicle emergence. *Seed Sci Res* 14: 267-276
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3: 1121-1130
- Yatsiv S, Flowers HM (1971) Action of  $\alpha$ -galactosidase on glycoprotein from human B-erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 45: 514-518
- Yuffá AM, de García EG, Nieto MS (1994) Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Rep* 13: 197-202



- Yuan JS, Yang X, Lai J, Lin H, Cheng ZM, Nonogaki H, Chen F (2007) The *endo- $\beta$ -mannanase* gene families in *Arabidopsis*, rice and poplar. *Funct Integr Genomics* 7: 1-16
- Zheng XQ, Ashihara H (2004) Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Sci* 166: 807-813
- Zheng XQ, Nagai C, Ashihara H (2004) Pyridine nucleotide cycle and trigonelline (*N*-methylnicotinic acid) synthesis in developing leaves and fruits of *Coffea arabica*. *Physiol Plant* 122: 404-411
- Zhu A, Goldstein J (1994) Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. *Gene* 140: 227-231
- Zhu A, Goldstein J (1995) Recombinant  $\alpha$ -galactosidase enzyme and cDNA encoding said enzyme. PCT WO95/07088
- Zhu A, Monahan C, Zhang Z, Hurst R, Leng L, Goldstein J (1995a) High level expression and purification of coffee bean  $\alpha$ -galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 324: 65-70
- Zhu A, Wang ZK, Goldstein J (1995b) Identification of tyrosine 108 in coffee bean  $\alpha$ -galactosidase as an essential residue for the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 1247: 260-264
- Zhu A, Monahan C, Wang ZK (1996) Trp-16 is essential for the activity of  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ -*N* acetylgalactosaminidase. *Biochim Biophys Acta* 1297: 99-104
- Zhu A, Wang ZK (1996) Expression and characterization of recombinant  $\alpha$ -galactosidase in baculovirus-infected insect cells. *Eur J Biochem* 235: 332-337
- Zhu A, Monahan C, Wang ZK (1996) Trp-16 is essential for the activity of  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ -*N* acetylgalactosaminidase. *Biochim Biophys Acta* 1297: 99-104

## Tableau récapitulatif des publications

Auteur	Année	Revue	Référence	Facteur d'impact <sup>3</sup>	Numéro DOI ( <a href="http://dx.doi.org/">http://dx.doi.org/</a> )
Geromel <i>et al.</i> <sup>1</sup>	2008	<i>Plant Physiol. Biochem.</i>	46: 569-579	1,669 (2007)	10.1016/j.plaphy.2008.02.006
Geromel <i>et al.</i> <sup>1</sup>	2008	<i>Ann. Appl. Biol.</i>	152: 179-187	1,752 (2007)	10.1111/j.1744-7348.2007.00199.x
Geromel <i>et al.</i> <sup>1</sup>	2006	<i>J. Exp. Bot.</i>	57: 3243-3258	3,630	10.1093/jxb/erl084
De Castro and Marraccini <sup>1</sup>	2006	<i>Braz. J. Plant Physiol.</i>	18: 175-199	n.d.	10.1590/S1677-04202006000100013
Leroy <i>et al.</i>	2006	<i>Braz. J. Plant Physiol.</i>	18: 229-24	n.d.	10.1590/S1677-04202006000100016
Leroy <i>et al.</i>	2005	<i>Theor. Applied Genet.</i>	111: 1032-1041	3,063	10.1007/s00122-005-0018-z
Marraccini <i>et al.</i> <sup>1</sup>	2005	<i>Plant Physiol. Biochem.</i>	43: 909-920	1,556	10.1016/j.plaphy.2005.08.010
Gaborit <i>et al.</i> <sup>1</sup>	2003	<i>Braz. J. Plant. Physiol.</i>	15: 55-58	n.d.	10.1590/S1677-04202003000100008
Marraccini <i>et al.</i> <sup>1</sup>	2003	<i>Plant Physiol. Biochem.</i>	41: 17-25	1,729	10.1016/S0981-9428(02)00004-9
Avila <i>et al.</i>	2002	<i>Ann. For. Sci.</i>	59: 669-673	1,156	10.1051/forest:2002054
Marraccini <i>et al.</i> <sup>1</sup>	2001	<i>Planta</i>	213: 296-308	3,349	10.1007/s004250100541
Avila <i>et al.</i>	2001	<i>Physiol. Plant.</i>	112: 388-396	1,760	10.1034/j.1399-3054.2001.1120312.x
Marraccini <i>et al.</i> <sup>1</sup>	1999	<i>Plant Physiol. Biochem.</i>	37: 273-282	1,347	10.1016/S0981-9428(99)80025-4
Rogers <i>et al.</i>	1999	<i>Plant Physiol. Biochem.</i>	37: 261-272	1,347	10.1016/S0981-9428(99)80024-2
Marraccini <i>et al.</i> <sup>2</sup>	1994	<i>Mol. Microbiol.</i>	12: 1005-1012	5,142	10.1111/j.1365-2958.1994.tb01088.x
Mermet-Bouvier <i>et al.</i> <sup>2</sup>	1993	<i>Curr. Microbiol.</i>	27: 323-327	1,087	10.1007/BF01568955
Marraccini <i>et al.</i> <sup>2</sup>	1993	<i>Plant Mol. Biol.</i>	23: 905-909	3,415	10.1007/BF00021546

n.d. : revue non indexée dans « Journal Citation Report » (JCR)

<sup>1</sup> : auteur pour la correspondance de l'article

<sup>2</sup> : articles (non présentés dans ce mémoire) issus de ma thèse d'université

<sup>3</sup> : facteur d'impact de l'année de publication

Moyenne de citation des articles<sup>21</sup>: 7,00

Indice H<sup>21</sup> : 8

<sup>21</sup> D'après scHolar index: <http://www-ihm.lri.fr/~roussel/moulinette/h/h.cgi>



(Photo Credit: Pierre Marascchi, CIRAD)



(Photo Credit: Pierre Marascchi, CIRAD)

### Figure 1 : Exemples de plantes de caféier

(A): *Coffea canephora* var. Conilon (Incaper, ferme expérimentale de Marilândia-ES)

(B): *Coffea arabica* L. cv. IAPAR 59 (Embrapa Cerrado, Planaltina-DF).



(Photo Credit: Pierre Marascchi, CIRAD)

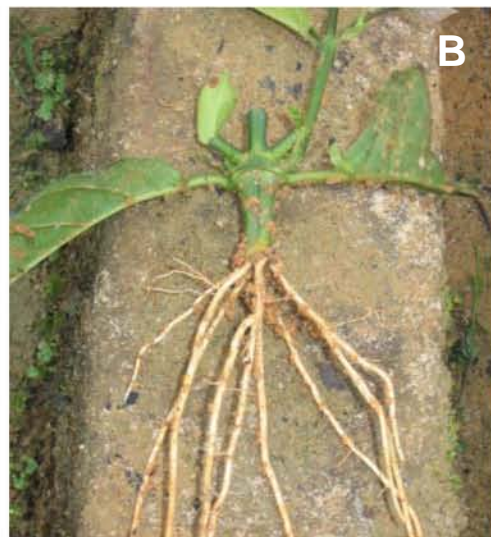


(Photo Credit: Pierre Marascchi, CIRAD)

### Figure 1

(C): feuilles de *Coffea arabica* infestées par *Perileucoptera coffeella* (les pupes sont montrées dans l'encadré) (Etablissement Café Chaulet, Guadeloupe)

(D): *Coffea arabica* L. cv. Rubi en condition de stress hydrique prolongé (Embrapa Cerrado, Planaltina-DF).



(Photo Credit: Pierre Marracchini, CIRAD)

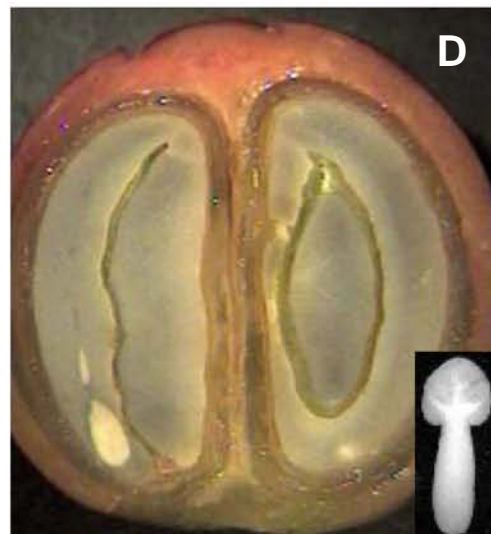
## Figure 2 : Les modes de propagation du caféier

(A): par germination des semences (*Coffea arabica*) (photo UMR DGPC)

(B): par bouturage (*Coffea canephora*)



(Photo Credit: Pierre Marracchini, CIRAD)



## Figure 2 : La reproduction du caféier

(C): floraison sur les rameaux plagiotropes (*Coffea canephora* var. Apoatã, IAPAR, Londrina-PR).

(D): coupe longitudinale de cerise mature de *Coffea arabica* var. Acaiá Cerrado MG-1474 montrant les deux grains (d'après De Castro et Marracchini, 2006). L'embryon est montré dans l'encadré. La barre représente 2mm.





(Photo Credit: Pierre Manacini, CIRAD)

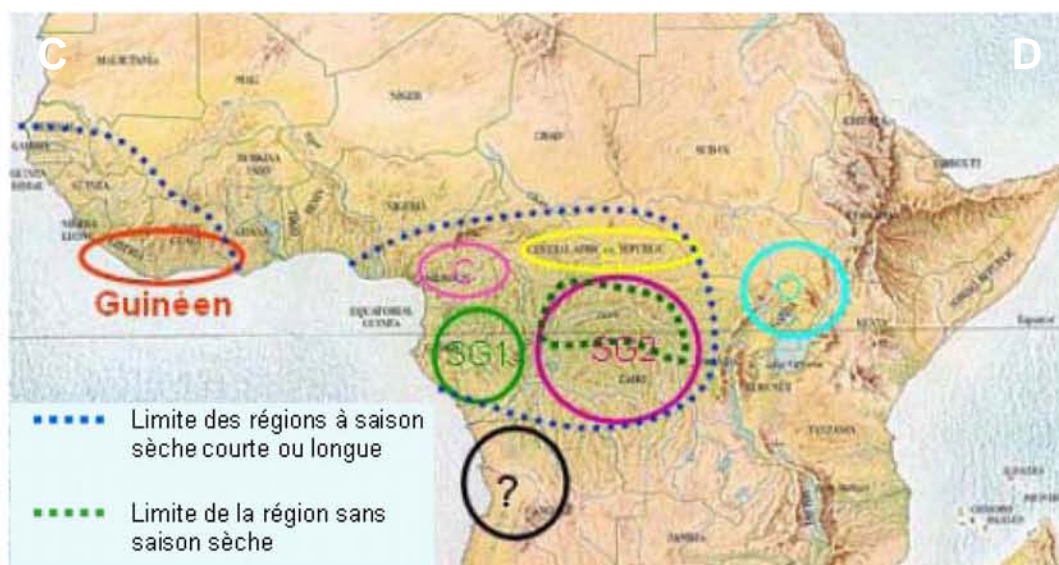


(Photo Credit: Pierre Manacini, CIRAD)

**Figure 3 : La récolte et le traitement post-récolte des cerises de caféier**

(A): récolte manuelle (IAPAR, Londrina-PR).

(B): séchage des cerises au soleil (voie sèche) pour la production de café « em coco »(IAPAR, Londrina-PR).



**Figure 4 : Répartition des groupes de diversité de *Coffea canephora***

(d'après Montagnon, 2000).

Groupes de diversité	Localisation	Principales caractéristiques
Guinéens	Afrique de l'ouest (Guinée et Côte d'Ivoire)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- petites feuilles</li> <li>- petits grains, maturation précoce</li> <li>- forte teneur en caféine</li> <li>- qualité à la tasse médiocre</li> <li>- sensible à la rouille</li> <li>- tolérant à la sécheresse</li> </ul>
SG1	Gabon et sud du Congo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- feuilles moyennes</li> <li>- forte teneur en caféine</li> <li>- amertume et faible acidité à la tasse</li> <li>- très tolérant à la sécheresse</li> </ul>
SG2	Afrique centrale (République RDC, sud RCA et sud-est Cameroun)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- feuilles grandes et larges</li> <li>- maturité tardive des grains</li> <li>- faible teneur en caféine</li> <li>- tolérant à la rouille</li> <li>- sensible à la sécheresse</li> </ul>

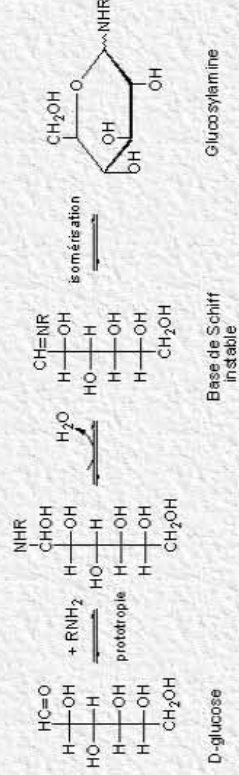
**Table 1 : Principales caractéristiques des groupes de *Coffea canephora***  
(d'après Montagnon, 2000).

Component	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>
pH	5.26-6.11	5.27-6.13
Mineral content *	3.5-4.5	3.9-4.5
Fat content *	13-17	7.2-11
Caffeine content *	0.7-2.2 (average 1.4)	1.5-2.8 (average 2.2)
Chlorogenic acids content *	4.80-6.14	5.34-6.41
Trigonelline*	1- 1.2	0.6-1.7
Oligosaccharides*	6 - 8	5 - 7
Total polysaccharides*	50 - 55	37 - 47

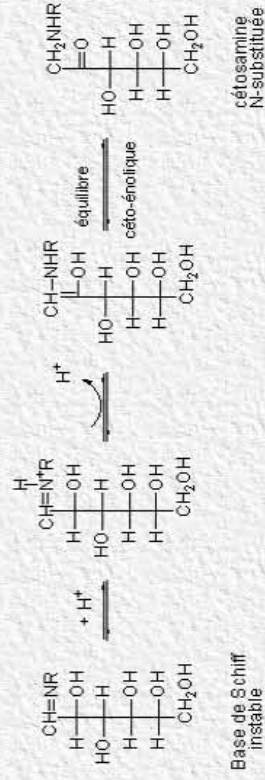
**Table 2 : Teneurs de quelques composés biochimiques des grains verts de *C. arabica* et *C. canephora*.**

\*: pourcentage de matière sèche (d'après Leroy *et al.*, 2006).

### 1 Condensation de Maillard entre le glucose et une amine



### 2 Réarrangement d'Amadori



### 3 Déshydratation forte : synthèse d'un furfural

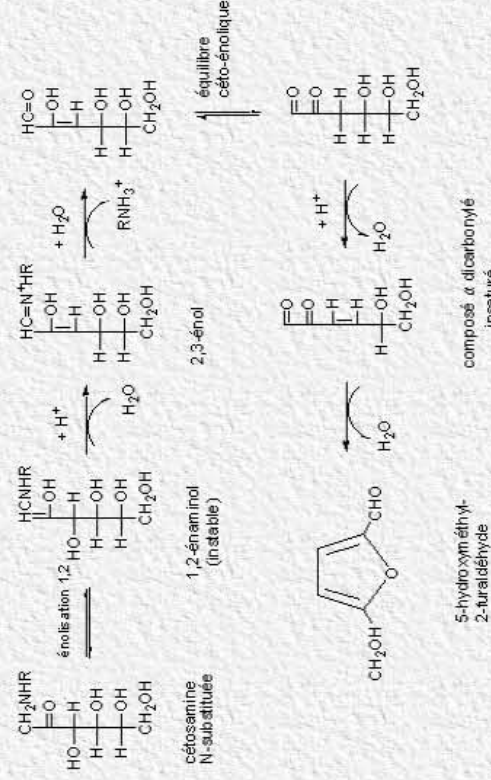
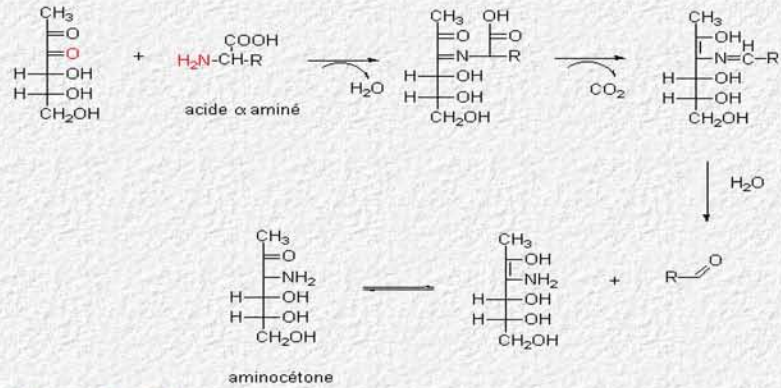


Figure 5A : Les étapes des réactions de Maillard

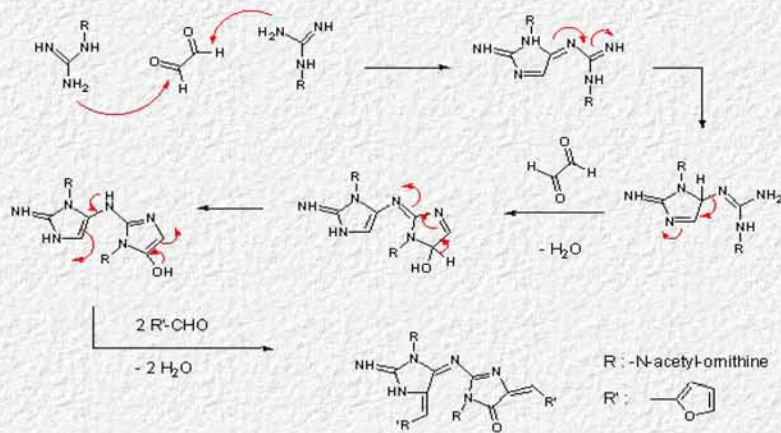
(d'après [http://www.ens-lyon.fr/DSM/magistere/projets\\_biblio/2001/emessine/etapes1.htm#mclanoidine](http://www.ens-lyon.fr/DSM/magistere/projets_biblio/2001/emessine/etapes1.htm#mclanoidine))



#### 4● Dégradation de Strecker



#### 5● Polymérisation : synthèse d'une mélanoïdine



#### ● Scission ou polymérisation

Les composés obtenus lors des réactions 3, 4 et 5 donnent :

- par scission : **des produits volatils et odorants,**
- par polymérisation (celle-ci fait principalement intervenir des condensations aldoliques) :  
les mélanoïdines

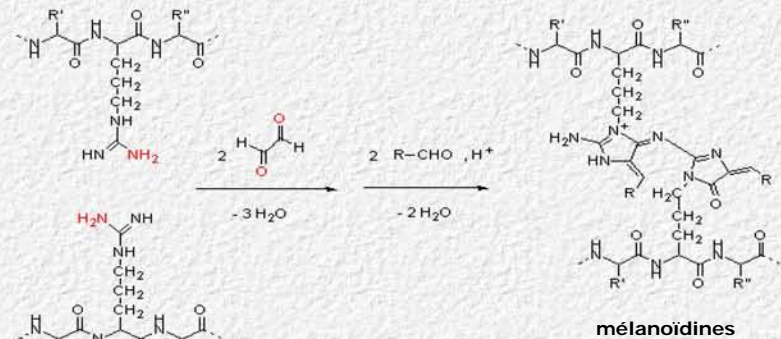


Figure 5B : Les étapes des réactions de Maillard (suite)

(d'après [http://www.ens-lyon.fr/DSM/magistere/projets\\_biblio/2001/emessine/etapes1.htm#mélanoïdine](http://www.ens-lyon.fr/DSM/magistere/projets_biblio/2001/emessine/etapes1.htm#mélanoïdine))



			
Génotypes	<i>C. arabica</i> (2 cv.) <i>C. canephora</i> (1 cl.) <i>C. racemosa</i>	<i>C. canephora</i> (5 cl.)	<i>C. canephora</i> (5 cl.)
EST	153 729	47000	10420
Bibliothèques ADNc	40	5	2
Tissus	Feuilles Fruits Fleurs Cals...	Feuilles Fruits	Feuilles Fruits
Données	NL	DP	DP

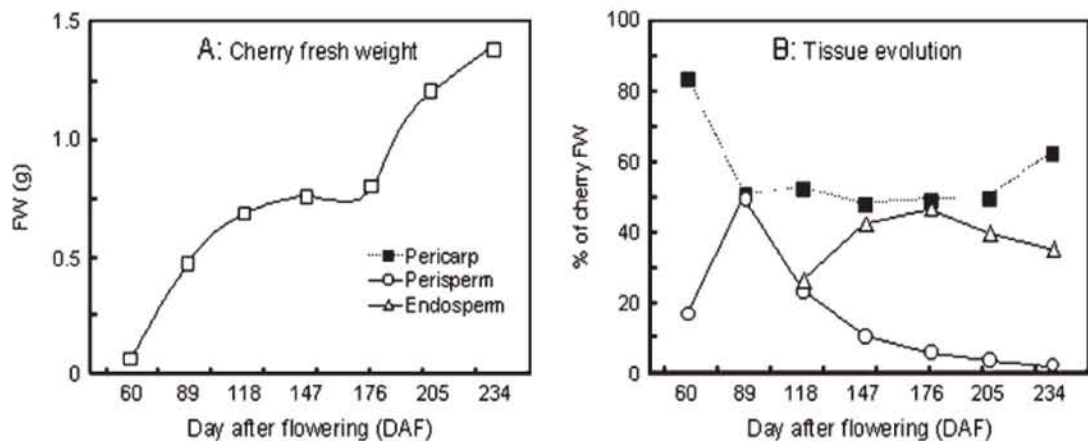
**Table 3 : Les différents projets de génomique de *Coffea*.**

cv.: cultivar

cl.: clones

NL: données non libérées dans le domaine public

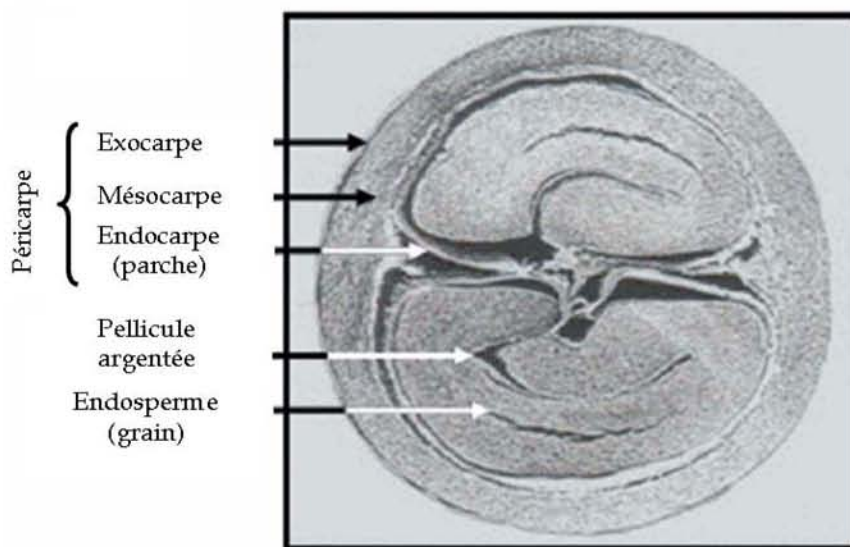
DP: données libérées dans le domaine public



**Figure 6 : Evolution du poids frais des tissus séparés des fruits de *C. arabica* cv. IAPAR 59 en cours de maturation .**

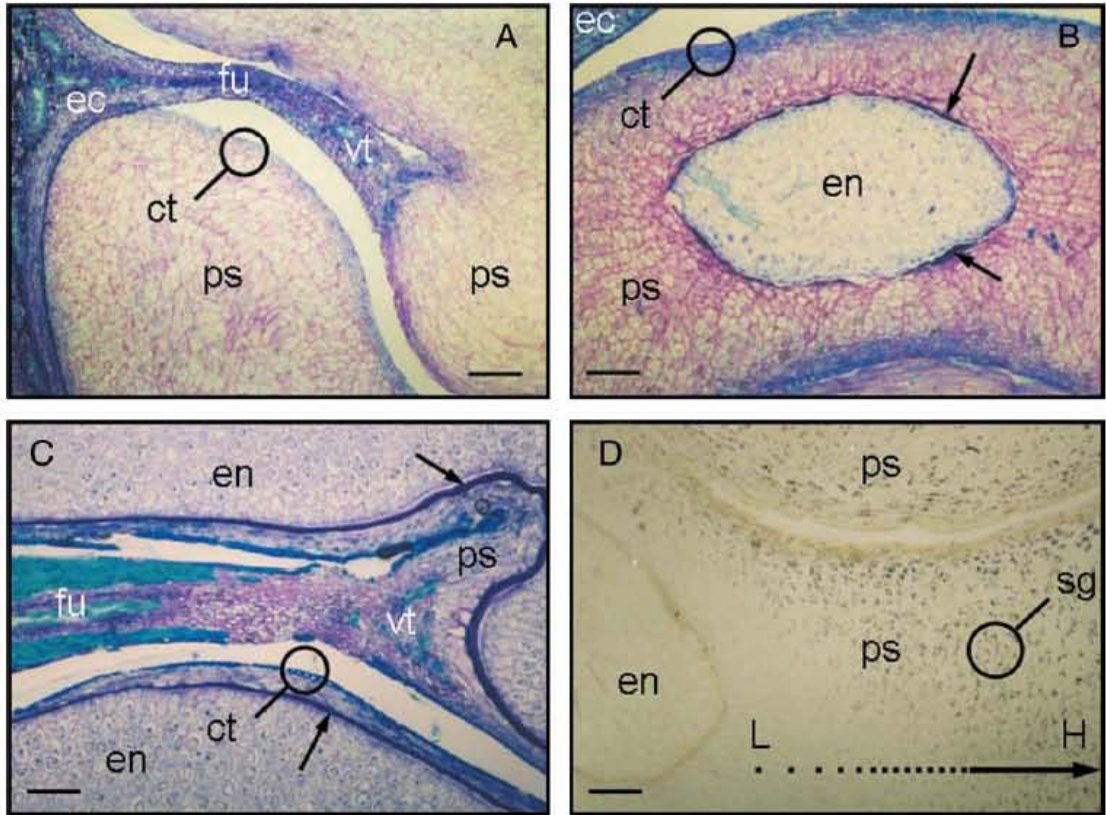
(A): courbe du poids frais des fruits exprimé en gr

(B): courbes des poids frais du péricarpe (■), du périsperme (o) et de l'endosperme (Δ) exprimés en pourcentage du poids frais total du fruit (d'après Geromel *et al.*, 2006).



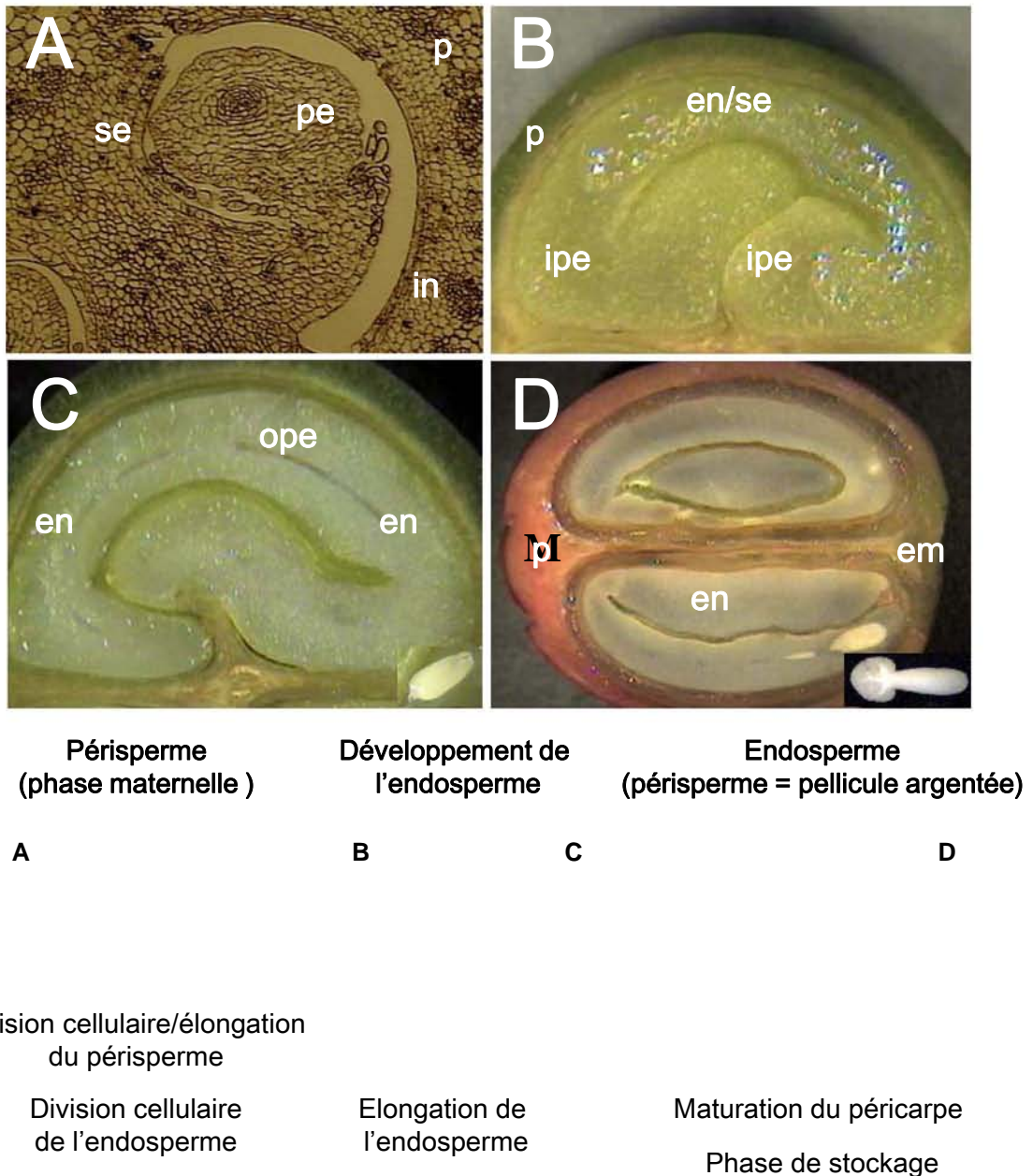
**Figure 7: Coupe transversale d'une cerise mature de caféier**

La cerise mature (220-250 JAF) est coupée transversalement pour faire apparaître les différents tissus. A ce stade de maturation, l'endosperme est le tissu majoritaire et le périsperme est réduit à la pellicule argentée. L'embryon localisé en position distale n'est pas observable (d'après Geromel *et al.*, 2006).



**Figure 8 : Coupes histologiques des fruits de *C. arabica* cv. IAPAR 59 à différents stades de la maturation.**

Les fruits à  $\approx 40$  JAF (A), 60-75 JAF (B, D) et 205-234 DAF (C) ont été colorés au bleu de toluidine pour montrer l'endocarpe (ec), le perisperme (ps), l'endosperme (en), le tissu vasculaire (vt) situé dans le funicule (fu) et la couche "cuticulaire" (ct) entourant le périsperme. Les flèches noires montrent les cellules à l'interface périsperme-endosperme. (D) Les granules d'amidon (sg) révélés par la coloration de Lugol sont indiqués. Une flèche pointillée indique le gradient d'amidon dans le périsperme, orienté des concentrations basses (L) vers les concentrations élevées (H) en amidon, c'est à dire respectivement dans les régions proches et éloignées de l'endosperme. Les barres représentent 200  $\mu\text{m}$  (A, C, D) et 80  $\mu\text{m}$  (B).



Division cellulaire/élongation  
du péricarpe

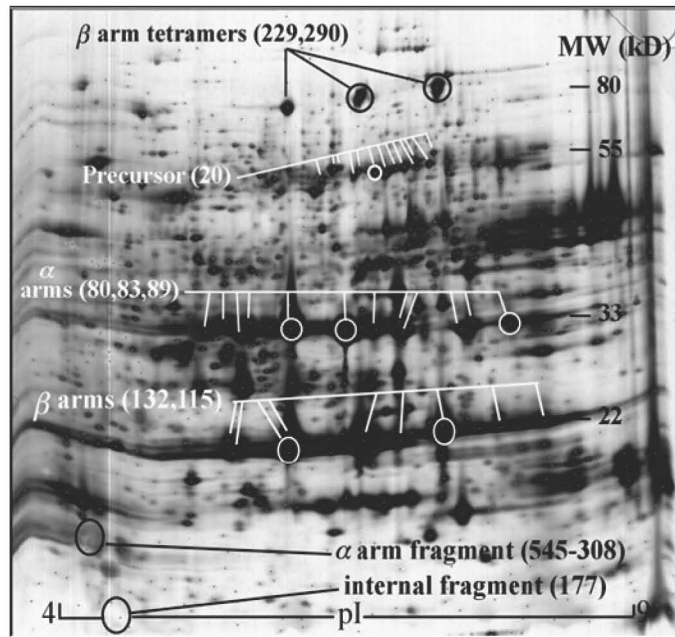
Division cellulaire  
de l'endosperme

Elongation de  
l'endosperme

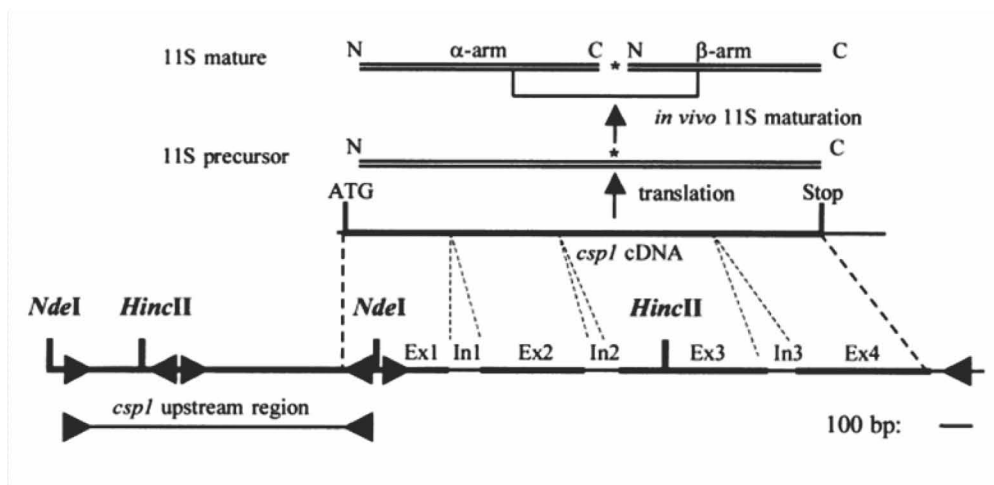
Maturation du péricarpe  
Phase de stockage

**Figure 9: Les différentes phases de la maturation du grain de caféier (*C. arabica* var. Acaia Cerrado MG-1474).**

A: ovaire après l'anthèse (0-60 JAF: jours après la floraison) montrant le péricarpe (pe), le tégument (in: "integument") qui entoure et soutient l'ovule et le jeune sac d'embryonnaire (Se) qui évoluera pour donner l'endosperme (en) (x 60). B: section transversale du fruit à 90 JAF montrant le péricarpe (p) et l'endosperme liquide (en), également désigné sous le nom de "vraie graine" (Se), qui se développe à l'intérieur du péricarpe (ipe). C: section transversale du fruit entre 120 et 150 JAF montrant la couche externe restante du péricarpe (ope) et renfermant l'endosperme laiteux. L'embryon est représenté à l'échelle en bas à droite. D: section longitudinale des fruits à 230-240 JAF montrant les deux graines mûres renfermant un embryon (em) qui est isolé (en bas à droite). Les barres (B à D) représentent 2 mm. En-dessous est présenté un schéma indiquant les différentes étapes du développement du fruit de caféier (adapté d'après De Castro et Marraccini, 2006).

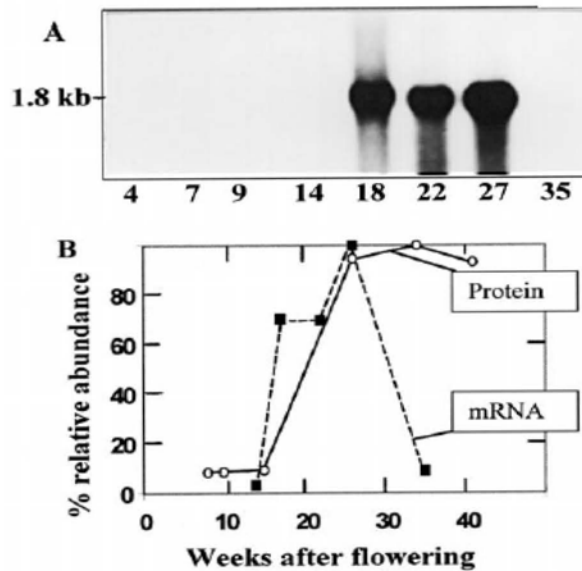


**Figure 10: Gel 2-DE des protéines du grain de *C. arabica* cv. Caturra 2308 au stade mature montrant la répartition des protéines de réserve.**  
(d'après Rogers *et al.*, 1999a).



**Figure 11: Organisation du gène *CaCSP1* de *C. arabica* cv. Caturra 2308**

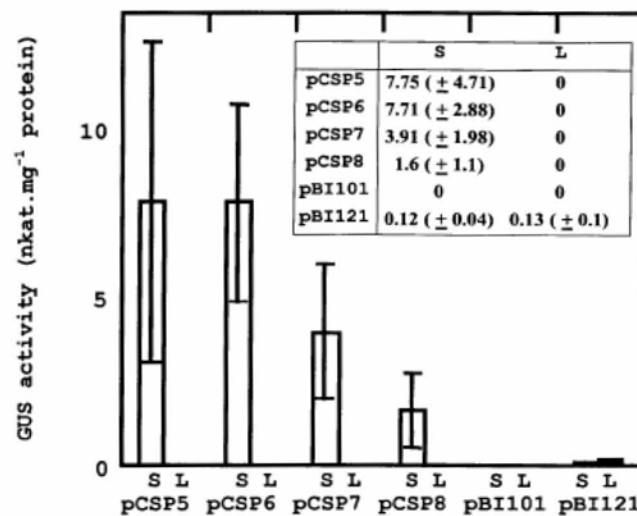
Le gène *CaCSP1* est représenté avec ses exons (Ex) et ses introns (In). Le précurseur 11S, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont symbolisés par une double ligne. Un astérisque marque l'emplacement du site de clivage (N/GLEET) du précurseur 11S. Le pont disulfure reliant les bras  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que la position du fragment du promoteur (fragment 1000pb) sont également montrés (adapté d'après Marraccini *et al.*, 1999).



**Figure 12 : Accumulation des ARNm *CaCSP1* et des protéines 11S pendant la maturation du grain de *C. arabica* cv. Caturra 2308**

(A) Northern-blot des ARN *CaCSP1*

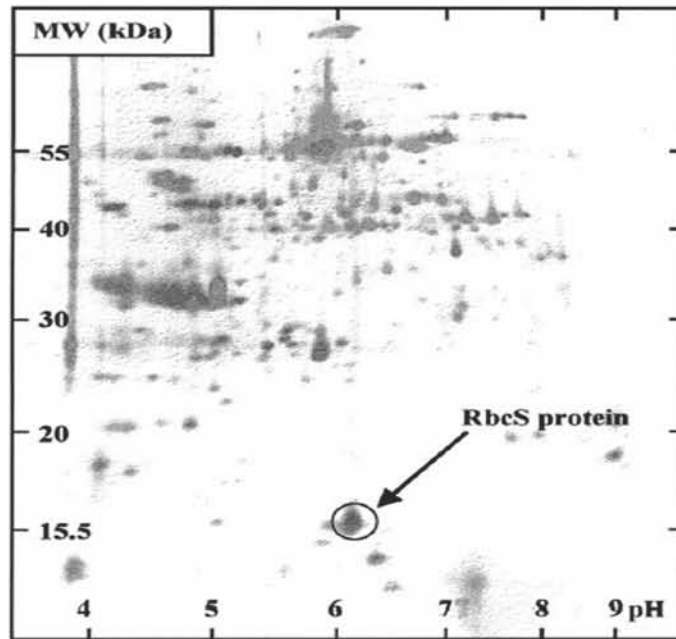
(B) Profils d'abondance obtenu par le balayage densitométrique des protéines 11S et des ARNm *CaCSP1* (adapté d'après Rogers *et al.*, 1999a).



**Figure 13: Activité GUS dans les tabacs transformés par les différentes constructions du promoteur du gène *CaCSP1*.**

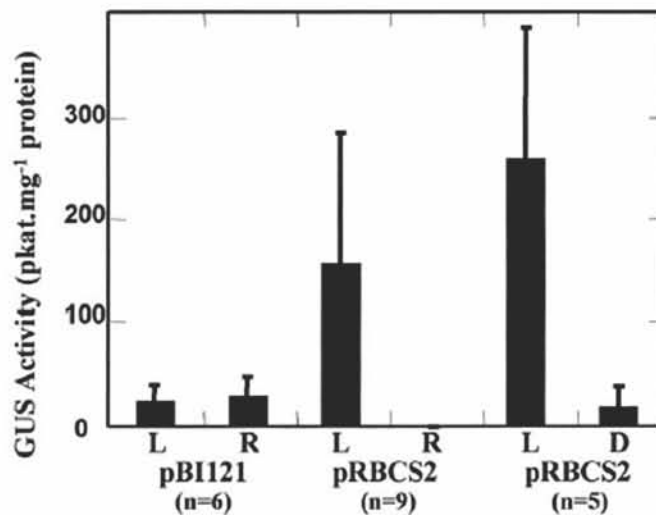
L'activité GUS (exprimée en nkat.mg<sup>-1</sup> de protéines) a été mesurée en feuilles (L) et les graines (S) des tabacs transformés avec les délétions dans la région 5' du promoteur du gène *CaCSP1* (pCSP5=945pb, pCSP6=695 pb, pCSP7=445pb et pCSP8=245pb). Contrôle négatif pBI101 (sans promoteur) et positif pBI121 (promoteur 35S du CaMV) (d'après Marraccini *et al.*, 1999).





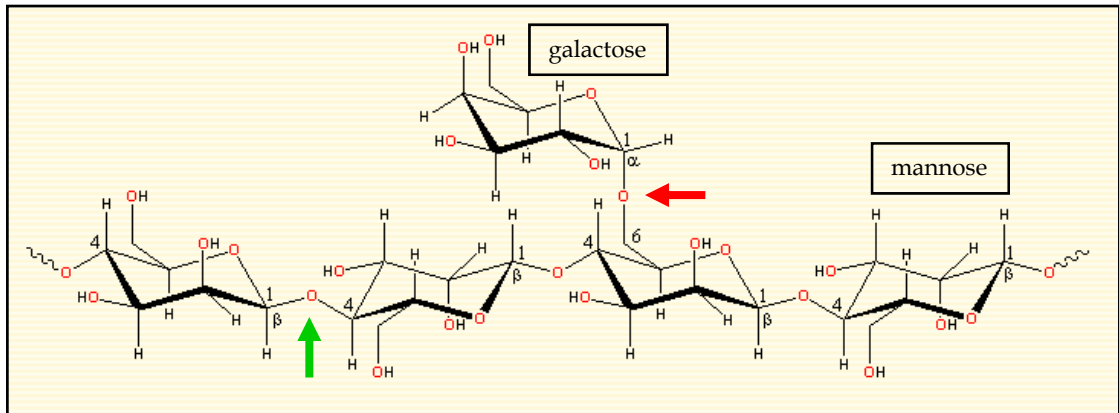
**Figure 14 :** Gel d'électrophorèse bidimensionnel (2-DE) des protéines de feuilles de *C. arabica* cv. Caturra 2308.

Le protéine RbcS (PM  $\approx$  16kDa et pI  $\approx$  6) est entourée (adapté d'après Marraccini *et al.*, 2003).



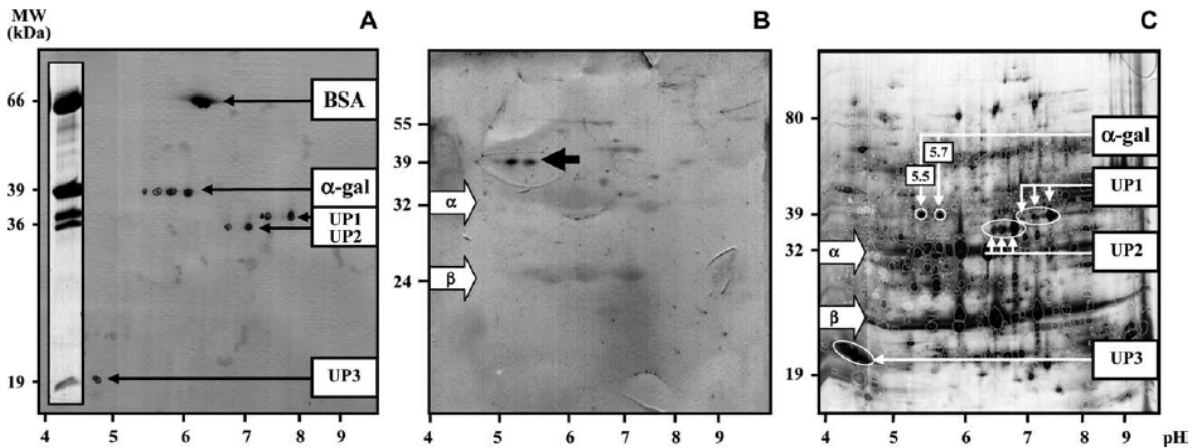
**Figure 15: Activité GUS dans les tabacs transformés par le promoteur du gène *CaRBCS1*.**

L'activité GUS (exprimée en nkat.mg<sup>-1</sup> de protéines) a été mesurée dans les feuilles (L) et les racines (R) des tabacs transformés avec le promoteur du gène *CaRBCS1* (pRBCS2) ainsi que dans les feuilles des tabacs cultivés à l'obscurité durant 24h (D). Contrôle positif pBI121 (promoteur 35S du CaMV). Le chiffre (n) indique le nombre de plantes analysées (d'après Marraccini *et al.*, 2003).



### Figure 16 : Structure des galactomannanes

Sur la chaîne de (1→4)-β-D-mannopyranose, les résidus α-D-galactose sont liés par une liaison α1→6. Le schéma représente un galactomannane de rapport Gal/Man 4:1. La flèche rouge indique le site d'action de l'α-D-galactosidase et la flèche verte celui de l'endo-β-1-4-D-mannanohydrolase. (d'après <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyloc.html>)



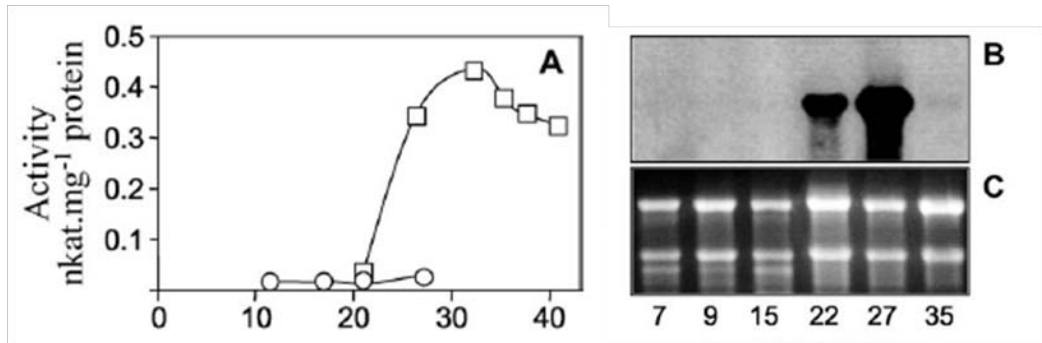
### Figure 17: Analyse par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) de l'α-galactosidase (α-Gal) du grain de caféier (*C. arabica* L. cv. Caturra 2308).

(A): la préparation commerciale d'α-D-galactosidase a été analysée par 2-DE et les protéines ont été identifiées par séquençage N-terminal. Le gel SDS-PAGE de la même préparation a été inséré dans la partie gauche du graphique. UP représente les protéines non identifiées.

(B): les protéines extraites à partir des grains mûrs (40 SAF) de *C. arabica* cv. Caturra T2308 ont été séparées par gel 2-DE et testées avec les anticorps polyclonaux dirigés contre l'α-D-galactosidase commerciale. Les deux isoformes d'α-Gal identifiées sont indiquées par une flèche noire.

(C): même extrait protéique que (B) coloré au nitrate d'argent. Les flèches et les cercles blancs indiquent les positions des protéines (α-Gal et UP) identifiées par séquençage N-terminal. Les flèches α et β indiquent la position des fragments des protéines de réserve 11S. Pour chaque gel, les marqueurs de poids moléculaire (gauche) et l'échelle de pH (bas) sont indiqués (d'après Marraccini *et al.*, 2005).





**Figure 18 : Expression de l' $\alpha$ -D-galactosidase durant la maturation des grains de *C. arabica* cv. Caturra 2308**

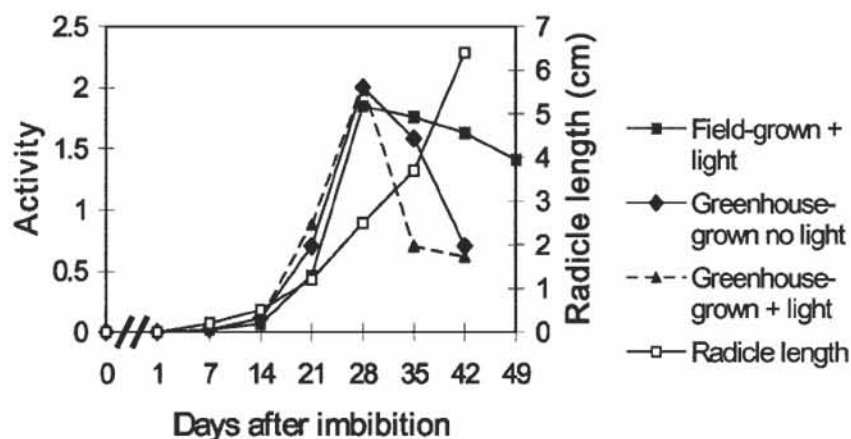
(A) Activité  $\alpha$ -galactosidase dans le périsperme (O) et l'endosperme (□).

(B) Northern-blot *CaGAL1* au cours de la maturation.

(C) ARNs totaux déposés sur le gel Northern-blot .

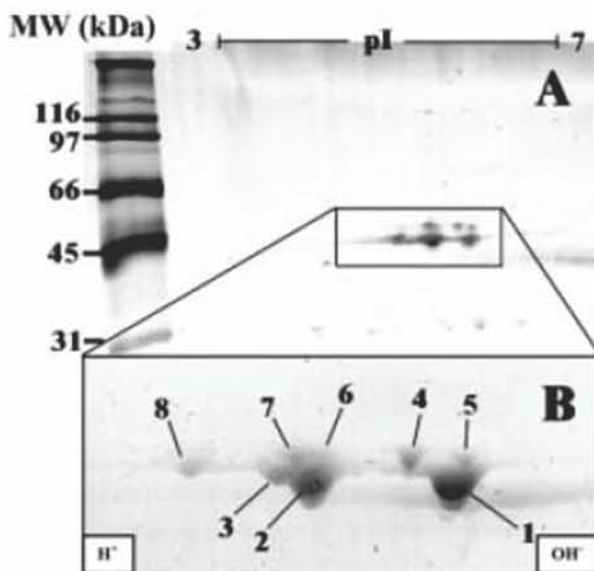
Les temps de maturation en abscisse sont exprimés en semaines après la floraison (SAF)

(d'après Marraccini *et al.*, 2005).



**Figure 19: Activité mannanase dans les grains de *C. arabica* cv. Caturra 2308 en cours de germination**

L'activité mannanase a été mesurée dans les grains en cours de germination au champs (■) ou en serre avec (▲) ou sans lumière (◆). La taille du radicule (□) est exprimée en cm. (d'après Marraccini *et al.*, 2001).



**Figure 20: Analyse par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) de la mannanase de caféier purifiée au cours de la germination des fruits de *C. arabica* cv. Caturra 2308**

(A) Environ 8 protéines de PM identiques et de pI variant de 5.5 à 6.0 sont identifiées dans la fraction purifiée présentant une activité endo- $\beta$ -mannanase à 28 JAI (jours après imbibition) .

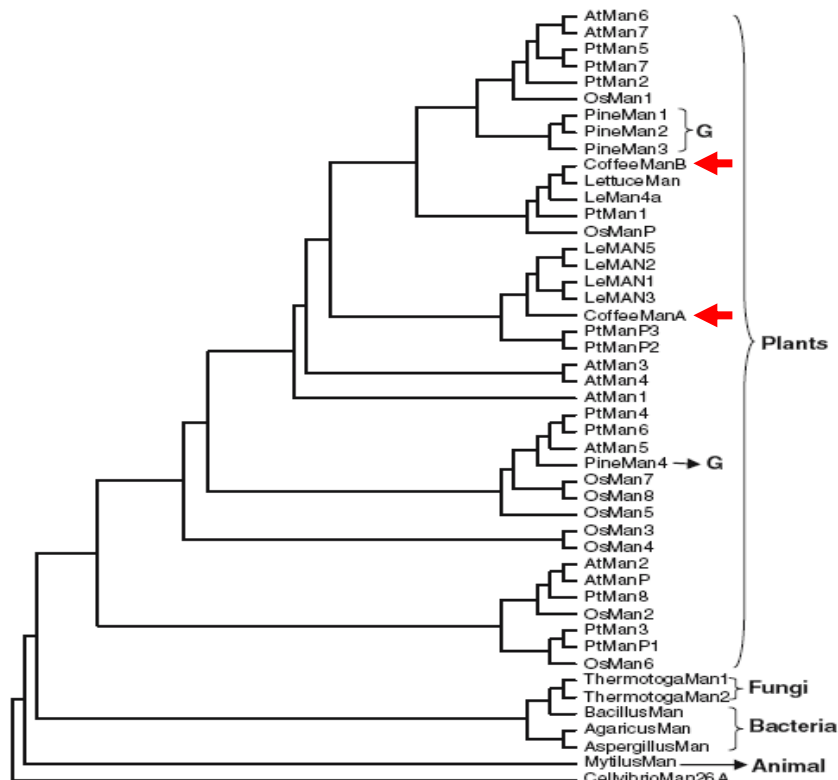
(B) Les protéines 1-5 , 7 et 8 sont apparentées à la protéine CaMANB.

(d'après Marraccini *et al.*, 2001).

<i>LeMAN1</i>	HVMTADARSLIN
<i>LeMAN2</i>	HAMTALAHIVKI
<i>LeMAN3</i>	HIMTALAHSLNHE
<i>LeMAN4a</i>	LLQSLRLSKIS
<i>LeMAN4i</i>	LLQSLAD
<i>CaMANA</i>	QSNKIRNSKEQ
<i>CaMANB</i>	QSNRLSSLT
<i>DcMAN1</i>	AMAALSHOV
<i>LsMAN1</i>	NSSTNLEFSPVAVD

**Figure 21: Comparaison des séquences d'acides aminés des extrémités C-terminale de plusieurs endo- $\beta$ -mannanases végétales.**

Les séquences sont déduites des ADNc *CaMANA* (mnémonique GenBank AJ293305), *CaMANB* (AJ278996), *DcMAN1* (carotte: AF545503), *LeMAN1* (AAB87859), *LeMAN2* (AF184238), *LeMAN3* (AF290893), *LeMAN4a* (enzyme active, AY046588), *LeMAN4i* (enzyme inactive, AY046589) et *LsMAN1* (laitue: AJ315978). La leucine essentielle à l'activité est encadrée alors que la leucine surlignée en noir, commune à toutes les endo- $\beta$ -mannanases, est non essentielle à l'activité enzymatique (d'après Gong et Bewley, 2007).



**Figure 22: Comparaison des séquences de plusieurs endo- $\beta$ -mannanases.**

Les protéines *CaMANA* et *CaMANB* sont indiquées par des flèches rouges.

G représente le groupe des gymnospermes.

(d'après Yuan *et al.*, 2007).

```

1  MAFSRRSN-----ISNFSCCFLVIVL---SLH-----CENHIVSSASRFIQTRGTRFVIGGYPIFFNGFNSSYMMHVAAEPSERH 1
1  VMSREKSL-----L--LRCCSLSLAF---ILLGVGEGHGEIASNSTSSSFSFVKTRGTEFVNGRPFVNLGNFAYWLMYMASDPSTRT 2
1  MSYARRSC-----I-----CGIFLDEL---ALV-----CEAN-----SGFIVGKDSHFELNGSPFLFNGFNSSYWLMHVAAIPTRRY 3
1  MAAPTGNPVPVILGFLTCVAFIYLSFGDLWF-----GLKTEGELAFVKRNGTQFVVDGKALYVNGMNSYWMFMDHVDHNSRH 4
1  MV-PTNRNPMRLRIIGPFICAAFIYLSERDLW-----NHKGKAKLGFVKRNGTQFVVDKPLVYVNGMNSYWMFMDHVDHNSRH 5
1  M--KDQLG----FRIVLCSAVFIILTQNRALADLDESSEHVNSSEVSGEEQWEMVQRKGQOFTLNGCPFYVNGFNTYVMMTLAADNSTRG 6
1  M-----KQ----LCEI---VLLAIVIAQSY--VGVEAAPSDGFVSRNGVQFILNGKPPFYANGFNAYWLAYEATIPTRF 7
1  N-----KQ----LCFV--VLLAILIAQNSSDLGVKSPASDGFVSRKGVQFILNGKPPFYANGFNAYWLAYEATIPTRF 8

75  KISNVREBAATGLTVCRTWAFSDGG--DRALQMSPCVYDERVFCALDFVSEARKYGVHLILSLTNNYKDFGGRTQYVWAKNAGVQVNS 1
81  KVSTTFQCASKYGMNAARTWAFSDGG--YRALQSPGSPYDEMFGLDFVSEAKKYGIHLILSLVNNWBGYGGKQYVQWARGHGLNN 2
64  KYTEVLKASAVGLSCRTWAFSDGG--DRALQISPGIYDERVFCGLDFVIAEAKRYGA-----QVSN 3
79  RVSAMLEAGAKMGLTVCRTWAFNDGG--YNALQISPGRFDERVFKALHIVIAEAKTH-----GVSS 4
78  LVGEMLEAGAKMGLTVCRTWAFNDGG--YNALQISPGRFDERVFCALHIVIAEAKRHVDVHLILSLVNNLQAYGGKTQYVWAWQBGVGLSS 5
84  KYTEVFCQASAVGMTVGRTWAFNDGG--YRALQKSPSYDEMFGLDFVSEAKKYGIHLILSLVNNWDAYGGKQYVWAKNAGSLNLS 6
66  KITNVFCNATSLGLTIARTWGRDGAIRALQTPGSDYDQTFQGLDFVIAEAKRIGIKLILSLVNNWDDYGGKQYVWAWQBGVGLSS 7
68  KITVYFCNATIHDLTIVRTWGRDGG--YRALQIAPGVYDEKTFQGLDFVIAEAKRLGINKLITFVNNYSDFGKQYVWAKNAGVQVNS 8

164  DDD--FYTKNAVKGYYKNHKKVLTIRNTISRWAYKDDPTVMAWELINEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 1
170  DDD--FTTDFIVRGYFKNHKKVLTIRNSITGLAYKDDPTIFAWELMNEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 2
125  DDE--FYTHPMIRKYYLKNHKKVLTIRNSITIRWAYKDDPTIFAWELMNEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 3
138  SIDSFFDPSIRRYFKNYLTULLTRNSITGLIEYRNDPTIFAWELINEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 4
167  SIDSFFDPSIRRYFKNYLTULLTRNSITGLIEYRNDPTIFAWELINEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 5
173  DDD--FTTDFIVRGYFKNHKKVLTIRNSITGLAYKDDPTIFAWELMNEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 6
156  NDD--FYRNPVIRKDYKNHKKVLTIRNVNTPTRWAYKDEPTIFAWELMNEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 7
157  DDD--FYTNPLVIRKDYKNHKKVLTIRNVNTPTRWAYKDEPTIFAWELMNEPRCQVDSGKTIWAVQEMATYVKSLENDKHLLEISMBGFYGD 8

253  SMRGGKQ--YNP---GYQVGTDFITNNILKEIDFATIHAYPIHWSLQSDGACMMEMRRHMTSHSTDSKTLKKPLVLAEFGKSSKDPQVS 1
259  SVFQKKQ--YNP---GYQVGTDFISNNRIVQVDFATIHLYPDQWVPNSNDETCQCFVDRMIKEHILLSKYILLEKELLLTEFGKSSRSPQY 2
214  SIBERKS--VNP---GYQVGTDFISNNILKEIDFATIHAYPIHWSLQSDGACMMEMRRHMTSHSTDSKTLKKPLVLAEFGKSSRSPQY 3
228  SSP--KKLTVNPERWASGLGDFVRNSDSPNIDFASVHIYPDHWFHDQGFBEKLFVVKWMLSHIEDGDKBLKKPVLFTFEGFLSNLNDYD 4
257  NSP--GGLTVNPEQWASGLGDFVRNSDSPNIDFASVHIYPDHWFHDQGFBEKLFVVKWMLSHIEDGDKBLKKPVLFTFEGFLSNLNDYD 5
262  SAPAR--TRFNENPYAAQVGTDFIRNNQVLGIDFASVHIYPDLSWISPAVNSFLBETSSWMQAHVEDAEMYLGMVPLFTFEGFLSAHDPGFN 6
245  SSPERKNSLNPVS--ANVTCQDFIANHNIDAFDASVHICGSLWFLQRLDQNSRLAIFKRWLEGHIEDAQNLKKPVILAEFGFLSDTPRYT 7
246  SSPQRKTSLNPA--ANVLGTDFIANHKLDAIDFASVHISYPLWFLPNLDEKSRLLNLLRKNLECHIEDAQNLKKPVILAEFGFLSDTPRYT 8

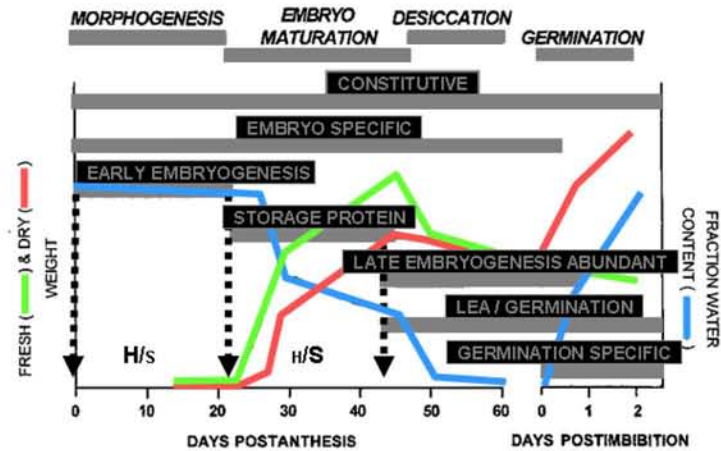
339  LYAFESMAAAYGLIYR--FARRGG--IAGGLVWQILAEGMOPYPADGYEIVLSQNPSTGRIISQSQSQMTSLDHSSNRTNSQSNKLRNS- 1
345  VAKRDAYLSHINTIYACAAATRGCGGCGGMLFQWYMAPGMBESWGDGYEIVLEENPSTGVYIACQSNRSLT 2
298  --SRDTEMSSSVYRNVN--IAKGGGAAGSLVWQLMAHGMENYDQGYCIVLGQTPSTTCTISDAHVMTAL-----A- 3
317  PSQRDRFYRTIFDVVYKSAKRKSG--AGILVWQLIEGMBGFNDGFIYVPEQDSIQRLMIEQSCRLSRIT-----GRHLLDKKS 4
346  PSQRDRFYRTIFDVVYKSAKRKSG--AGILVWQLFMEGMBTFNDFGIYVPEQDSIQRLMIEQSCRLSRIT-----GR-LKEOKL 5
351  TSFRDMINTVYKMTLNS--TRKGGAGAGSLVWQVFPQGEFMDGAYVYLTTRAHTASKIISLQSKRLAIFNSLCSWRCRWGCKKKNQTA 6
334  LANRDGVFTTITVYIYAS--ACKGGGAAGALFWEVISEGMSNFAGPSSITLSDKSSITVNIISEHARKMGLI-----GET--T- 7
335  GACRDVAFNATFDITYES--AEKGGGAAGALFWEVISEGMSNFAGPSSITLSDKSSITVNIISEHARKMGLI-----RGKGLSKT- 8

425  -----KEQZ 1
416  -----RSLN 2
366  -----RSLN 3
396  IE--MCSHRP 4
424  KE--LCSHRH 5
439  LDALLSHDEL 6
407  -----RK 7
413  -----KI 8

```

**Figure 23: Alignement des séquences protéiques de quelques endo- $\beta$ -mannanases végétales.**

Les numéros d'accension GenBank des séquences nucléotidiques utilisées pour déduire les protéines sont donnés entre parenthèse: 1, *Coffea arabica* manA (AJ293305), 2, *Coffea arabica* manB (AJ278996), 3, *Solanum lycopersicum* (AJ017144), 4, *Arabidopsis thaliana* At2G20680 (chromosome 2, AC006234), 5, *Arabidopsis thaliana* At4G28320 (chromosome 4, AL161572), 6, *Arabidopsis thaliana* T20L15 (chromosome 5, AL162351), 7, *Arabidopsis thaliana* T7M13.2 (chromosome 3, AC011708\_2) et 8, *Arabidopsis thaliana* T7M13.3 (chromosome 3, AC011708\_3). Les acides aminés Glu-210 et Glu-327 (sur la séquence CaMANA) sont indiqués par une flèche rouge.  
(d'après Marraccini *et al.*, 2001).



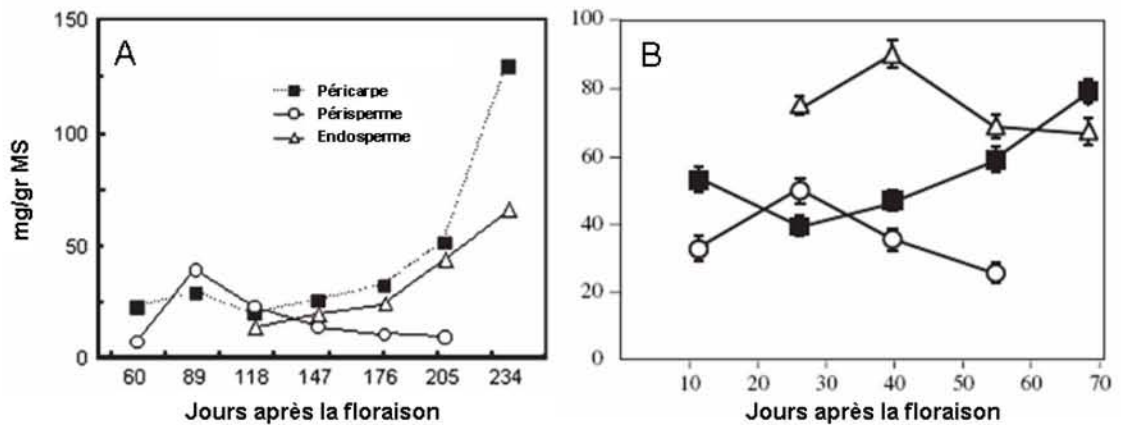
**Figure 24: Les différentes phases de développement des semences.**

H, hexoses; S, saccharose; H/S, rapport hexoses/saccharose

H/s: phase de division et de différenciation cellulaire

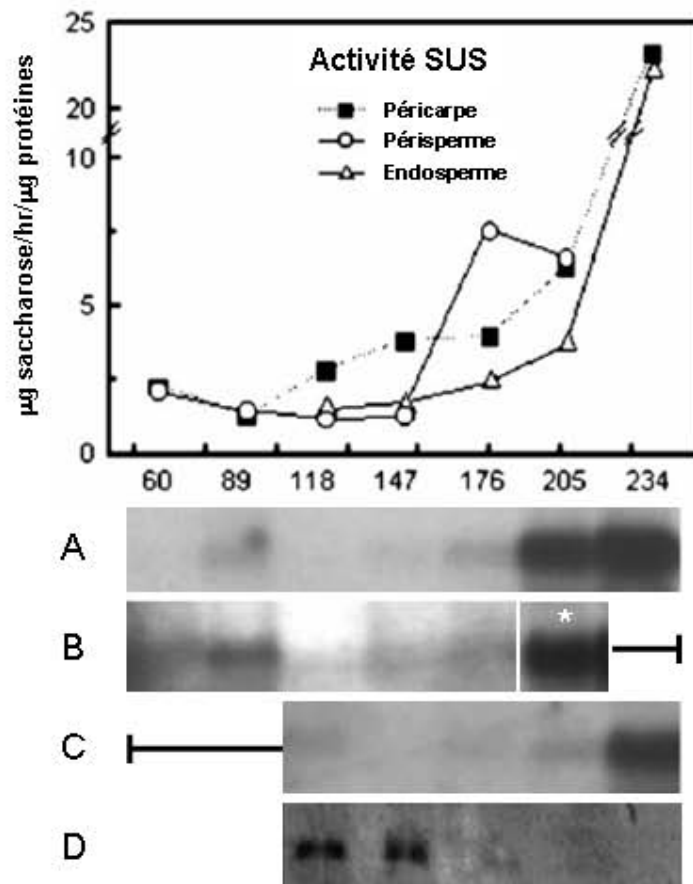
H/S: phase d'élongation cellulaire et de stockage (protéines de réserve...)

(d'après Golberg *et al.*, 1989).



**Figure 25: Evolution des teneurs en saccharose au cours du développement des grains de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 et *Coffea racemosa*.**

Les teneurs en saccharose sont exprimées en mg/gr de matière sèche dans le péricarpe (■), le périsperme (○) et l'endosperme (Δ) des grains de *Coffea arabica* (A, Geromel *et al.*, 2006) et *Coffea racemosa* (B, Geromel *et al.*, 2008a).



**Figure 26: Activité SUS et expression du gène *CaSUS2* au cours du développement des grains de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 .**

L'activité SUS est exprimée en  $\mu\text{g saccharose/hr}/\mu\text{g protéines}$  dans le péricarpe (■), le périsperme (○) et l'endosperme (Δ). L'expression du gène *CaSUS2* est montrée dans le péricarpe (A), le périsperme (B) et l'endosperme (C). (\*) : expression du gène *CaSUS2* à 205 JAF (endosperme et périsperme). D: Western-blot des protéines de l'endosperme avec les anticorps dirigés contre l'isoforme PsSUS1 des téguments de pois. Le temps de maturation est indiqué en jours après la floraison (JAF). (d'après Geromel *et al.*, 2006)